

Antibacterial Activity of Ethanol Extract of Cocoa Leaves (*Theobroma cacao* L.) Against Gastrointestinal Infection Bacteria Tract Infection by Agar Diffusion Method

Nur Fajriah Sya'baniyah Herman¹, Fitriana^{2*}, St. Maryam³

¹Faculty of Pharmacy, Universitas Muslim Indonesia, Makassar, South Sulawesi, 90231, Indonesia

²Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Universitas Muslim Indonesia, Makassar, South Sulawesi, 90231, Indonesia

³Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Universitas Muslim Indonesia, Makassar, South Sulawesi, 90231, Indonesia

ABSTRACT	
Article info Received: 26/07/2024	<p>The cocoa plant (<i>Theobroma cacao</i> L.) leaves contain secondary metabolites, including flavonoids, saponins, and tannins, known for their potential antibacterial properties. This study aims to evaluate the antibacterial activity of the ethanol extract of cocoa leaves (<i>Theobroma cacao</i> L.) against bacteria that cause gastrointestinal infections using the agar diffusion method. The study assessed the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the extract. The results showed that the ethanol extract exhibited significant antibacterial activity, particularly at concentrations of 2.5%, 5%, and 10%, with the highest inhibition zone observed at 10% concentration. The extract was most effective against <i>Escherichia coli</i>, <i>Salmonella typhi</i>, <i>Shigella dysenteriae</i>, and <i>Vibrio cholerae</i>, with inhibition zones of 15.34 mm, 15.60 mm, 13.81 mm, and 16.43 mm, respectively. These findings suggest that cocoa leaf extract has the potential to be developed as an antibacterial agent against gastrointestinal pathogens.</p>
Available online: 21/05/2025	
Corresponding Author: Fitriana Department of Microbiology Faculty of Pharmacy, Universitas Muslim Indonesia, Makassar, South Sulawesi, Indonesia email: fitriana.fitriana@umi.ac.id	
Keyword:	Agar diffusion method, antibacterial activity, Cocoa leaves, gastrointestinal infection, MIC, MBC, secondary metabolites, dan <i>Theobroma cacao</i> L.

Copyright ©2025 by Author
Journal Microbiology Science by Faculty of Pharmacy Universitas Muslim Indonesia is licensed under a [Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).



PENDAHULUAN

Penyakit infeksi saluran pencernaan yang disebabkan oleh mikroba semakin banyak menyerang masyarakat Indonesia. Kejadian ini dibuktikan dengan angka prevalensi penyakit diare yang semakin meningkat. Pada umumnya mikroba yang merupakan penyebab gangguan saluran pencernaan masuk ke dalam tubuh manusia melalui oral. Ribuan mikroba menempel pada tangan manusia yang

kemudian ikut masuk ke dalam tubuh manusia bersamaan dengan makanan yang masuk ke dalam mulut¹.

Penyakit infeksi terjadi ketika interaksi dengan mikroba menyebabkan kerusakan pada tubuh host dan kerusakan tersebut menimbulkan berbagai gejala dan tanda klinis. Mikroorganisme². Beberapa Jenis bakteri yang paling sering menyebabkan infeksi pada saluran pencernaan adalah bakteri famili

enterobacteriaceae. Beberapa bakteri penyebab infeksi pencernaan adalah bakteri famili enterobacteriaceae.

Daun kakao mengandung senyawa metabolit sekunder yaitu Flavonoid, saponin dan tanin yang dimana pada senyawa metabolit sekunder lebih besar kandungannya yaitu Flavonoid³. Karena flavonoid mampu melepaskan energi tranduksi terhadap membran sitoplasma bakteri dan menghambat motilitas bakteri, selain itu gugus hidroksil pada struktur flavonoid mengakibatkan perubahan komponen organik dan transpor nutrisi yang akhirnya menimbulkan efek toksik terhadap bakteri⁴. Daun kakao mengandung theobramine, kafein, anthocianin, leucoanthochianin, dan catechol yang jumlahnya bervariasi yang dipengaruhi oleh umur daun dan umur tanaman⁵. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol daun kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap bakteri penyebab infeksi saluran pencernaan menggunakan metode difusi agar.

Penyakit infeksi merupakan penyebab utama dengan tingginya kasus kematian terutama pada negara-negara yang berkembang. Seperti halnya di Indonesia. Salah satu penyakit infeksi saluran pencernaan dapat disebabkan oleh virus, bakteri, dan protozoa. Gangguan infeksi saluran pencernaan misalnya diare, demam tifoid, disentri basiler, kolera, ulkus usus, dan gastroenteritis. Beberapa bakteri

penyebab infeksi saluran pencernaan seperti *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*⁶. Tingginya infeksi menyebabkan penggunaan antibiotik sebagai upaya masyarakat untuk mengatasi infeksi. Antibiotik merupakan obat yang digunakan untuk mengobati infeksi bakteri. Antibiotik dapat menghambat atau dapat membunuh bakteri. Adapun permasalahan dengan penggunaan antibiotik yaitu resistensi antibiotik⁷.

Resistensi antibiotik mengakibatkan bakteri yang kebal terhadap antibakteri⁸. Faktor penyebab resistensi antibiotik adalah penggunaan antibiotik banyak yang tidak sesuai, penggunaan tidak tepat dan penggunaan antibiotik yang melebihi dosis⁹. Meningkatnya penggunaan antibiotik di berbagai sektor kesehatan dan pertanian menyebabkan munculnya resistensi antibiotik di seluruh dunia. Resistensi ini terjadi pada beberapa jenis mikroorganisme dengan prevalensi tinggi yang mengancam manusia kesehatan. Masalah ini telah menjadi salah satu ancaman kesehatan masyarakat utama, saat ini dan WHO telah memperkirakan bahwa terjadi 10 juta kematian pada tahun 2050 karena peningkatan resistensi antimikroba¹⁰.

Menurut penelitian (Nurman *et al*, 2018) menyatakan bahwa daun coklat adalah sumber senyawa metabolit sekunder dari senyawa Flavonoid. Berdasarkan penelitian tersebut,

menunjukkan bahwa Flavonoid terdapat pada daun cokelat (*Theobroma cacao* L.). Flavonoid merupakan salah satu senyawa zat polifenol alam yang terdapat di sebagian besar tanaman. Umumnya kelompok flavonoid yang terdapat dalam tanaman terdiri dari flavon, flavan, flavanol, katekin, dan antosianidin. Maka diperoleh hasil dari daun cokelat yang mengandung flavonoid memiliki aktivitas antibakteri.

Berdasarkan uraian diatas, maka telah dilakukan penelitian terkait dengan aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun cokelat (*Theobroma cacao* L.) terhadap bakteri penyebab infeksi saluran pencernaan dengan menggunakan metode difusi agar.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain seperangkat alat maserasi, seperangkat alat rotavapor, autoklaf (HICLAVE HVA-85), bejana maserasi, cawan petri (Normax), *disc blank* (MN 827 ATD), microplate (Iwaki), inkubator (Memmert), jangka sorong (Sigmat STENLESS), spektrofotometer UV-Vis (PD-303S), timbangan analitik (Chyo). Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah bakteri uji *Escherchia coli* (ATCC 25923), *Vibrio cholerae* (ATCC 14035), *Shigella dysenteria* (ATCC 13313), *Salmonella typhi* (NTCC 786), Daun cokelat (*Theobroma cacao* L.), *Dimetil Sulfoksida* (Merck, 1.02952.2500), Etanol 96% (Merck, 1.59010.2500), medium

Nutrient Broth (Merck, 1.05443.0500), medium *Nutrient Agar* (Merck, 1.05450.0500), Nacl Fisiologis 0,9% (Merk Sodium Chloride 0,9% Infus, No. Reg : GKL1641700549A1).

Pengambilan dan penyiapan sampel

Penelitian ini menggunakan daun cokelat (*Theobroma cacao* L.) yang diperoleh dari daerah Kabupaten Wajo. Sampel daun cokelat segar yang telah diperoleh kemudian disortasi basah, dicuci hingga bersih, dirajang, lalu dikeringkan dibawah sinar matahari secara tidak langsung hingga kering. Selanjutnya dilakukan sortasi kering dan dihaluskan dengan cara diblender hingga diperoleh serbuk halus yang homogen. Kemudian dilakukan maserasi pada sampel menggunakan pelarut etanol 96%.

Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Cokelat

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi. simplisia sampel halus daun cokelat dimasukkan 300g kedalam botol kaca, kemudian ditambahkan 5000mL pelarut etanol 96%. Sampel direndam dan didiamkan selama 3x 24 jam, terlindung dari cahaya matahari dan diaduk setiap hari sebanyak tiga kali sehari. Setelah hari ke-3 sampel disaring dan dipisahkan ampas dengan filtratnya menggunakan kertas saring. Ampas kemudian diremaserasi menggunakan pelarut yang sama. Filtrat yang diperoleh dari dua kali maserasi tersebut dikumpulkan, dan kemudian dipekatkan dengan menggunakan rotary

evaporator, hingga diperoleh ekstrak kental daun coklat¹¹.

Penyiapan mikroba uji.

Sebelum dilakukan peremajaan bakteri, dibuat terlebih dahulu medium agar miring dengan cara medium NA dituang ke dalam tabung reaksi lalu dibiarkan sampai medium memadat pada kemiringan 30°C, setelah medium memadat diambil masing-masing 1 koloni biakan bakteri uji (*Escherchia coli* ATCC 25923, *Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi* NTCC 786) menggunakan ose bulat, lalu diinokulasikan dengan cara digoreskan pada medium agar miring dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam¹².

Bakteri uji hasil peremajaan, masing-masing disuspensikan dengan larutan NaCl fisiologis 0,9% dan dimasukkan kedalam kuvet, kemudian diukur transmitannya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 580 nm pada 25% T untuk bakteri. Sebagai blanko digunakan NaCl fisiologis 0,9% steril¹³.

Uji skrining antibakteri

Ekstrak etanol daun coklat (*Theobroma cacao* L.) ditimbang sebanyak 10 mg lalu dimasukkan kedalam vial steril, setelah itu ekstrak daun coklat dilarutkan dengan DMSO sebanyak 0,2 mL. Setelah larut ditambahkan 9,8 mL medium NA, sehingga diperoleh konsentrasi 0,1%. Hasil campuran tersebut kemudian dituang kedalam cawan petri lalu dihomogenkan dan dibiarkan memadat. Bakteri yang telah

disuspensikan sebelumnya, kemudian diambil masing-masing menggunakan ose bulat lalu digoreskan diatas medium yang telah dibuat sebelumnya. Kemudian di inkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam. Diamati aktivitas antimikrobanya, aktivitas antimikrobanya dapat dilihat dengan ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri¹⁴. Pada kontrol negatif DMSO 10% tidak terbentuk zona hambat di sekitar sumur. Hal ini menunjukkan bahwa DMSO 10% yang digunakan sebagai pelarut pembuatan variasi konsentrasi tidak memiliki aktivitas antibakteri sehingga aktivitas antibakteri hanya berasal dari larutan uji bukan pelarut yang digunakan.

Uji konsentrasi hambatan minimum (KHM)

Penentuan nilai KHM dilakukan dengan cara stok sampel dimasukkan kedalam microplate 96 wells dan dilakukan pengenceran bertingkat dengan hasil konsentrasi akhir pada well, kemudian ditambahkan media cair Nutrient Broth (NB) dan larutan bakteri yang telah disuspensi dengan medium. Microplate yang telah diinokulasi dengan bakteri diinkubasi selama 24 jam pada inkubator dengan suhu 37°C. satu jam sebelum proses inkubasi selesai, ditambahkan 5 µL larutan 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC). Proses akhir dari pengujian ini adalah timbulnya warna merah yang mengindikasikan masih hidupnya bakteri yang diuji ke masing-masing sampel. Konsentrasi Hambat

Minimum (KHM) dilihat dari well pertama yang tidak warna merah¹⁵.

Uji konsentrasi bunuh minimum (KBM)

Dalam pengujian ini dilakukan uji konsentrasi bunuh minimum dengan menggunakan metode dilusi padat. Medium NA yang telah dibuat dan disterilkan dimasukkan kedalam cawan petri secara aseptis kemudian ditunggu hingga memadat. Hasil inkubasi pada pengujian KHM digoreskan di atas medium NA yang telah memadat, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Konsentrasi yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan dinyatakan sebagai nilai KBM⁹. Penentuan KBM dilakukan dengan melihat jika masih terdapat pertumbuhan bakteri setelah diinkubasi 1x24 jam pada piring petri dengan cara menghitung jumlah bintik-bintik putih yang terdapat pada kaca piring petri menggunakan colony counter. Piring petri yang tidak terdapat pertumbuhan koloni bakteri ditentukan sebagai KBM. Uji konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dilakukan dengan tujuan untuk menentukan nilai konsentrasi bunuh minimum dari suatu sampel dalam menghambat bakteri uji dengan menggoreskan hasil dari Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ke medium *Nutrient Agar* (NA) pada cawa petri. Dalam pengujian Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) merupakan pengujian yang dimaksudkan untuk melihat kadar bunuh minimum dari suatu sampel, dimana

apabila hasilnya tidak ada pertumbuhan setelah diinkubasi dinyatakan sebagai KBM¹⁶.

Uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi agar

Pengujian dengan metode ini dilakukan uji aktivitas antibiotika yang umum digunakan yaitu menggunakan metode difusi agar dengan menggunakan disk blank dan medium *Nutrient Agar* (NA). Ekstrak etanol bunga kersen dibuatkan masing – masing dalam konsentrasi 2,5%, 5%, dan 10%. Medium NA diambil sebanyak 10 mL dan ditambahkan dengan 20 µL suspensi bakteri uji *Escherichia coli*, lalu dimasukkan kedalam cawan petri. Kemudian ekstrak etanol yang dibuat dalam seri konsentrasi dimasukkan menggunakan mikropipet sebanyak 20 µL lalu ditetesi disk blank yang akan digunakan. Disk blank diletakkan diatas medium yang telah memadat. Setelah itu, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, lalu diamati dan diukur zona hambat yang terbentuk. Hal yang sama dilakukan untuk bakteri uji *Salmonella thypi*, *Shigella dysenteriae*, dan *Vibrio cholerae*¹⁷. Doksisisiklin banyak digunakan untuk pengobatan infeksi yang disebabkan oleh bakteri Gram positif dan Gram negatif terutama infeksi saluran pernafasan, saluran pencernaan dan saluran urinaria¹⁸. Sedangkan, aquadest sebagai kontrol negatif tidak membentuk zona bening pada sumuran. Hal ini karena aquadest tidak memiliki sifat antibakteri¹⁹.

Analisis Data

Analisis data hasil penelitian ini akan dianalisis dengan metode statistik menggunakan statistika, berdasarkan hasil dari data pengamatan aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun cokelat (*Theobroma cacao* L.) terhadap bakteri penyebab infeksi saluran pencernaan dengan metode difusi agar.

Penelitian ini menggunakan sampel daun cokelat (*Theobroma cacao* L.) yang bertujuan untuk memperoleh ekstrak etanol daun cokelat sebagai penghasil antibakteri terhadap beberapa bakteri uji dengan menggunakan metode difusi agar. Dimana diketahui bahwa pengujian aktivitas antibakteri merupakan suatu metode yang digunakan untuk melihat potensi suatu senyawa yang dapat memberikan efek sebagai antibakteri bagi mikroorganisme²⁰. Hasil ekstraksi dari sampel daun cokelat dapat dilihat pada tabel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 1. Hasil analisis persen rendamen ekstrak etanol daun cokelat (*Theobroma cacao* L.)

Sampel	Pelarut Etanol 96% (mL)	Berat Simplisia (g)	Berat Ekstrak (g)	Rendamen Ekstrak (%)
Ekstrak etanol daun cokelat	5000	300	9,97	3,323

Tujuan perhitungan rendemen adalah untuk mengetahui persentase atau seberapa besar zat yang tersari dalam pelarut yang digunakan, sehingga dapat menentukan berapa banyak ekstrak yang diperoleh dengan memperkirakan banyaknya serbuk yang digunakan²¹. Menurut Dewastisari (2018), nilai rendamen yang berkaitan dengan banyaknya kandungan bioaktif yang terkandung pada tumbuhan yang digunakan dalam proses ekstraksi²². Menurut Budiyanto (2015), semakin tinggi hasil rendamen ekstrak maka semakin tinggi kandungan zat yang tertarik pada suatu tanaman yang digunakan²³.

Pada pengujian skrining antibakteri menggunakan hasil ekstrak etanol kental daun cokelat (*Theobroma cacao* L.). Tujuan dilakukan pengujian skrining antibakteri yaitu untuk melihat potensi ekstrak etanol dalam memperlihatkan aktivitas antibakterinya yang ditandai dengan ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri pada medium. Pada pengujian skrining antibakteri digunakan beberapa bakteri antara lain *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* dan *Vibrio cholerae*. Hasil pengujian skrining antibakteri dapat dilihat pada tabel.

Tabel 2. Hasil pengujian skrining antibakteri ekstrak etanol daun cokelat (*Theobroma cacao* L.)

Bakteri uji	Konsentrasi %		
	0,1%	0,5%	1%
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+
<i>Shigella dysenteriae</i>	-	+	+
<i>Salmonella typhi</i>	-	-	+
<i>Vibrio cholerae</i>	-	-	+

Keterangan: (+)Menghambat pertumbuhan bakteri; (-) Tidak Menghambat pertumbuhan bakteri

Berdasarkan tabel diatas hasil data yang didapatkan pada pengujian skrining antibakteri dengan konsentrasi 0,1% ekstrak etanol daun cokelat (*Theobroma cacao* L.) memperoleh hasil positif mampu membunuh bakteri uji *Escherichia coli* dan hasil negatif yang diperoleh pada bakteri uji *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, dan *Vibrio cholerae*. Konsentrasi 0,5% memperoleh hasil positif pada bakteri uji *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* dan bakteri uji *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi* memperoleh hasil negatif. Konsentrasi 1% memperoleh hasil positif pada bakteri uji *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio*

cholerae, dan *Salmonella typhi*. Kemudian dilanjutkan dengan pengujian Konsentrasi Hambat Minimum (KHM).

Pengujian Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) menggunakan metode mikrodilusi dan pengamatan yang dilakukan diamati secara visual menggunakan triphenyltetrazolium chloride (TTC). Pengujian dengan menggunakan 7 konsentrasi ekstrak etanol daun cokelat (*Theobroma cacao* L.) yaitu 0,25%, 0,5%, 1%, 2%, 4%, 8%, 16%. Hasil pengujian KHM dapat dilihat pada tabel.

Tabel 3. Hasil pengujian Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ekstrak etanol daun cokelat (*Theobroma cacao* L.)

Bakteri uji	Konsentrasi (%)								Nilai KHM	
	0,25%	0,5%	1%	2%	4%	8%	16%	K+		K-
<i>Escherichia coli</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	0,5%
<i>Shigella dysenteriae</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	0,5%
<i>Salmonella typhi</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	0,5%
<i>Vibrio cholerae</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	0,5%

Keterangan: (+)Menghambat pertumbuhan bakteri; (-) Tidak Menghambat pertumbuhan bakteri

Berdasarkan tabel diatas hasil data yang didapatkan bahwa nilai KHM dari ekstrak etanol daun cokelat (*Theobroma*

cacao L.) untuk bakteri uji *Escherichia coli*, *Shigella dysentriae*, *Salmonella typhi*, dan *Vibrio cholerae* adalah pada konsentrasi

0,25%. Pertumbuhan koloni pada konsentrasi 0,25% terdapat perbedaan bermakna dengan kontrol negatif (aquadest). Ini menjelaskan bahwa Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) terdapat pada konsentrasi 0,25%. Hal ini disebabkan jumlah rata-rata koloni yang tumbuh pada konsentrasi 0,25% lebih sedikit dibandingkan dengan aquadest²⁴.

Tabel 4. Hasil pengujian Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ekstrak etanol daun coklat (*Theobroma cacao* L.)

Bakteri uji	Konsentrasi (%)							Nilai KBM
	0,25%	0,5%	1%	2%	4%	8%	16%	
<i>E. coli</i>	-	-	+	+	+	+	+	1%
<i>S. dysenteriae</i>	-	-	+	+	+	+	+	1%
<i>S. typhi</i>	-	-	+	+	+	+	+	1%
<i>V. cholerae</i>	-	+	+	+	+	+	+	0,5%

Keterangan: (+)Menghambat pertumbuhan bakteri; (-) Tidak Menghambat pertumbuhan bakteri

Berdasarkan tabel diatas, Nilai KBM yang diperoleh terhadap bakteri *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi* adalah 1% dan *Vibrio cholerae* adalah 0,5%. Selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi agar. Perbedaan besarnya diameter hambatan disebabkan karena perbedaan besarnya kandungan zat aktif pada masing-masing isolat. Perbedaan diameter hambatan dapat juga dipengaruhi oleh jenis bakterinya karena setiap bakteri memiliki tingkat kepekaan yang berbeda-beda terhadap sampel²⁵. Perbedaan sensitivitas bakteri terhadap antibakteri dapat dipengaruhi oleh

Uji Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dilakukan dengan melanjutkan hasil KHM. Uji konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dilakukan dengan tujuan untuk menentukan nilai konsentrasi bunuh minimum dari suatu sampel dalam menghambat bakteri uji. Adapun hasil dari pengujian KBM dapat dilihat pada tabel.

struktur dinding sel bakteri. Bakteri gram negatif hanya mengandung sedikit lapisan peptidoglikan, maka dinding bakteri gram negatif lebih rentan terhadap gangguan fisik²⁶. Bakteri *Vibrio cholerae* merupakan bakteri yang tidak tahan terhadap asam sehingga dengan kadar keasaman yang tinggi tersebut dapat menghambat dan membunuh bakteri *Vibrio cholerae*. Kemungkinan pengaruh materi organik pada penelitian ini adalah karena bakteri dapat melakukan penguraian materi organik secara anaerob yang dapat menghasilkan asam sehingga dapat meningkatkan kadar keasaman di sekitar bakteri dan dapat

menghambat serta membunuh bakteri *Vibrio cholerae*²⁷.

Pada pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun cokelat (*Theobroma cacao* L.) ini dilakukan menggunakan 3 seri konsentrasi yaitu 2,5%, 5%, dan 10%. Pada pengujian ini dibuat difusi agar dengan menggunakan kontrol positif dimana kontrol positifnya adalah antibiotik pembanding. Antibiotik pembanding yang digunakan yaitu doksisisiklin²⁸. Pada metode difusi menggunakan kontrol positif (doksisisiklin) dan kontrol negatif yaitu aquadest. Doksisisiklin banyak digunakan untuk pengobatan infeksi yang disebabkan oleh bakteri Gram positif dan Gram negatif terutama infeksi saluran pernafasan,

saluran pencernaan dan saluran urinaria¹⁸. Alasan penggunaan aquadest sebagai kontrol negatif karena aquadest merupakan senyawa netral yang tidak mengandung racun ataupun zat-zat yang dapat menghambat dan membunuh pertumbuhan bakteri²⁹. Pada pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun cokelat ini, semakin tinggi konsentrasi ekstrak semakin tinggi pula diameter zona hambat antibakteri yang dihasilkan. Pada pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun cokelat dilakukan menggunakan metode cakram.

Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun cokelat dapat dilihat pada tabel.

Tabel 5. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun cokelat (*Theobroma cacao* L.) secara difusi agar

Bakteri Uji	Replikasi	Diameter Zona Hambat (mm)				
		10%	5%	2,5%	K+	K-
<i>E. coli</i>	1	15,34	12,08	7,84	30,38	0
	2	14,11	12,89	11,03	31,27	0
	3	12,43	12,32	11,22	31,19	0
<i>S. typhi</i>	1	15,18	12,82	11,8	31,81	0
	2	14,62	13,94	12,77	32,70	0
	3	15,60	12,63	10,5	31,12	0
<i>S. dysenteriae</i>	1	13,81	11,82	9,35	29,23	0
	2	13,26	11,66	10,98	30,61	0
	3	13,79	12,79	11,93	30,59	0
<i>V. cholerae</i>	1	12,17	9,51	8,50	29,18	0
	2	15,17	11,77	10,28	29,87	0
	3	16,43	13,73	11,54	29,27	0

Keterangan: (K+) Doksisisiklin; (K-) Aquadest

Berdasarkan hasil pengujian difusi agar pada tabel diatas didapatkan bahwa ekstrak etanol daun cokelat secara difusi

agar dengan 3 seri konsentrasi 2,5%, 5%, dan 10% memiliki aktivitas antibakteri. Diameter zona hambat terbesar pada

kosentrasi 10%. Untuk bakteri *Escherichia coli* yaitu 15,34 mm, bakteri *Salmonella typhi* yaitu 15,60 mm, bakteri *Shigella dysenteriae* yaitu 13,81% mm, dan untuk bakteri *Vibrio cholerae* yaitu 16,43 mm. Serta kontrol positif doksisisiklin untuk bakteri *Escherichia coli* yaitu 31,27 mm, bakteri *Salmonella typhi* yaitu 32,70 mm, bakteri *Shigella dysenteriae* yaitu 30,61% mm, dan untuk bakteri *Vibrio cholerae* yaitu 29,87 mm.

Meningkatnya resistensi terhadap agen terapeutik telah merevitalisasi minat para ilmuwan dalam penemuan obat berbasis bahan alam. Saat ini, banyak obat-obatan yang berasal dari tumbuhan³⁰. Terdapat banyak tanaman obat dengan sifat antibakteri yang dapat mengobati masalah diare dengan lebih sedikit atau tanpa efek samping dibandingkan dengan obat konvensional. Aktivitas antibakteri dari bahan alam ini dikarenakan adanya metabolit sekunder yang aktif secara biologis seperti flavonoid, alkaloid, steroid, saponin dan terpenoid³¹. Respon hambatan mikroba gram positif lebih kuat dibandingkan mikroba gram negatif. Kemungkinan disebabkan oleh perbedaan komponen penyusun dinding sel antara mikroba gram positif dan gram negatif. Dinding sel mikroba gram positif banyak mengandung teikoat dan asam teikoronat serta molekul polisakarida³².

KESIMPULAN

Ekstrak etanol daun cokelat (*Theobroma cacao* L.) menunjukkan aktivitas antibakteri yang signifikan terhadap bakteri uji *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, dan *Vibrio cholerae*, yang merupakan penyebab umum infeksi saluran pencernaan. Nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) untuk semua bakteri uji adalah 0,25%, menunjukkan bahwa ekstrak ini efektif menghambat pertumbuhan bakteri pada konsentrasi rendah. Nilai Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) bervariasi, dengan *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, dan *Salmonella typhi* pada 1%, dan *Vibrio cholerae* pada 0,5%, menunjukkan bahwa ekstrak ini memiliki potensi sebagai agen bakterisida. Konsentrasi optimum ekstrak yang memberikan aktivitas antibakteri terbaik adalah 10%, yang menghasilkan diameter zona hambat terbesar dalam uji difusi agar.

Hasil ini mengindikasikan bahwa ekstrak etanol daun cokelat berpotensi digunakan sebagai alternatif alami atau tambahan untuk antibiotik konvensional dalam mengatasi infeksi bakteri, terutama pada kondisi di mana resistensi antibiotik menjadi masalah. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengidentifikasi senyawa aktif spesifik yang bertanggung jawab atas aktivitas antibakteri ini dan untuk mengevaluasi toksisitas serta efektivitasnya pada model *in vivo*. Studi ini juga membuka peluang untuk pengembangan produk

farmasi atau suplemen yang menggunakan ekstrak daun cokelat sebagai bahan aktif utama, khususnya dalam pengobatan infeksi saluran pencernaan.

DAFTAR PUSTAKA

- Larasati, D. A., & Apriliana, E. (2016). Efek Potensial Daun Kemangi (*Ocimum basilicum* L.) sebagai Pemanfaatan Hand Sanitizer. *Jurnal Majority*, 5(5), 124–129.
- Noor Mutsaqof, A. A., -, W., & Suryani, E. (2016). Sistem Pakar Untuk Mendiagnosis Penyakit Infeksi Menggunakan Forward Chaining. *Jurnal Teknologi & Informasi ITS smart*, 4(1), 43. <https://doi.org/10.20961/its.v4i1.1758>
- Mandhaki, N., Huda, C., & Putri, A. E. (2020). *Jurnal Sains dan Kesehatan*, 2(4), 426–431.
- Manik, D. F., Hertiani, T., & Ansory, H. (2014). Analisis Korelasi Antara Kadar Flavanoid Dengan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Dan Fraksi-Fraksi Daun Kersen. *Khazanah*, 6(2), 1–11.
- Supriyanto, Darmadji, P., & Susanti, I. (2014). *Production of Tea from Cocoa Leaves (Theobroma cacao L) as Refreshment Beverage. Agritech*, 34(4).
- Pratiwi, D., Fitriana, & Amirah, S. (2023). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Benalu Batu (*Begonia medicinalis*) Terhadap Bakteri Uji Penyebab Infeksi Saluran Pencernaan, 1(2), 98–107.
- Vinca, D. T., Iqbal, M., Triyandi, R., Oktarlina, R. Z., Kedokteran, F., Lampung, U., Kedokteran, F., & Lampung, U. (2023). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera* L.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* – Review Article: *Antibacterial Activity of Moringa Leaf Extract (Moringa oleifera L.) Against Staphylococcus aureus*. 13, 649–654.
- Lia Yunita, S., Novia Atmadani, R., & Titani, M. (2021). Faktor-faktor Yang Mempengaruhi Pengetahuan Dan Perilaku Penggunaan Antibiotika Pada Mahasiswa Farmasi UMM. *Pharmaceutical Journal of Indonesia*, 6(2), 119–123. <https://doi.org/10.21776/ub.pji.2021.006.02.7>
- Ni, A. K., Dewi, C., & Selvi, M. (2021). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix*) Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. 10(September), 6.
- Putri, C. I., Wardhana, M. F., Andrihanie, F., & Iqbal, M. (2023). Literature Review: Kejadian Resistensi Pada Penggunaan Antibiotik. *Journal of Medula*, 13(3).
- Hayati, A. R., Singkam, A. R., & Dewi, J. (2022). Uji Antibakteri Ekstrak Etanol Daun *Theobroma cacao* L. Terhadap Pertumbuhan *Escherichia coli* Dengan Metode Difusi Cakram. 5, 1–23.
- Asfi, D. (2021). Uji Efektivitas Losio Ekstrak Daun Kembang Sore (*Aboutilon indicum* L.) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Kesehatan Yamsi Makassar*, 5(1), 36.
- Nuryanti, S., Rusli, & Astuti, R. (2019). Green medical journal: *Pankreatitis Akut. Jurnal Kedokteran*, 1(1), 1–15. <https://greenmedicaljournal.umi.ac.id/index.php/gmj/article/download/27/21/>
- Maryam, St., Juniasti, S., & Kosman, R. (2015). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) Asal Kota Watampone. *Jurnal Ilmiah As-Syifaa*, 7(1), 60–69. <https://doi.org/10.33096/jifa.v7i1.21>
- Elkhair, E., Fadda, H., & Abu-Mohsen, U. (2010). *Antibacterial Activity and Phytochemical Analysis of Some Medicinal Plants from Gaza Strip – Palestine. Journal of Al-Azhar University-Gaza*, 1(2), 45–54.
- Shinta, A. P., Olivia, W., & Michael, L. A. (2016). Potensi Antibakteri Air Perasan Bawang Putih (*Allium sativum* L) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. *Pharmacon: Jurnal Ilmiah Farmasi – Unsrat*, 5(4).
- Nurung, A. H., Fitriana, & Herwin. (2022). Penentuan Aktivitas Antibakteri Fermentat Ekstrak Isolat Fungi Endofit Dari Daun Galing-Galing (*Cayratia trifolia* L). *As-Syifaa*, 14(1), 11–17.
- Soliman, A. M., Aboubakar, M., & El-Hewaity, M. (2015). *Bioequivalence Study of Two Oral Doxycycline Formulations (Doxysol and Doxymed) in Healthy Broiler Chickens. Pharmacology and Pharmacy Sci Res.*, 6, 1–8.
- Anatje, J. P., Cut Bidara, P. U., & Muhammad, T. P. (2022). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak

- Etanol Daun Tapak Dara (*Catharantus roseus*) Di Desa Lisabata Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* Dengan Menggunakan Metode Difusi Agar. *Jurnal JRIK*, 2(1).
20. Artanti, N. (2019). *Peran Uji Bioaktivitas untuk Penelitian Herbal dan Bahan Aktif untuk Obat Berbasis Keanekaragaman Hayati Indonesia*. Jakarta: LIPI Press.
 21. Ikhwan Rizki, M., Nurtely, N., Fadlilaturrahmah, F., & Ma'shumah, M. (2021). Skrining Fitokimia dan Penetapan Kadar Fenol Total pada Ekstrak Daun Nangka (*Artocarpus heterophyllus*), Cempedak (*Artocarpus integer*), dan Tarap (*Artocarpus odoratissimus*) Asal Desa Pengaron Kabupaten Banjar. *Jurnal Insan Farmasi Indonesia*, 4(1), 95–102.
 22. Dewatisari, W. F., Rumiyan, L., & Rakhmawati, I. (2018). Rendemen dan Skrining Fitokimia pada Ekstrak Daun *Sansevieria* sp. *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan*, 17(3).
 23. Budiyanto, A. (2015). Potensi Antioksidan, Inhibitor Tirosinase, dan Nilai Toksisitas dan Beberapa Spesies Tanaman Mangrove di Indonesia. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
 24. Afrina, C., Santi, M., & Risa, Y. (2016). Konsentrasi Hambat Dan Bunuh Minimum Ekstrak Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) Terhadap *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Secara In Vitro. *Cakradonya Dent J*, 8(1), 1–76.
 25. Baso, F. B. (2012). Uji Aktivitas Antimikroba dan Identifikasi Ekstrak Buah Sawo Manila (*Achras zapota* L.) terhadap Beberapa Mikroba. [Skripsi]. Makassar: Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar.
 26. Mardiyah, M., Alhidayatullah, & Nurhalisa. (2021). Aktivitas Antimikroba Jamur Tiram Putih (*Pleurotus ostreatus* AL1) terhadap *Candida albicans* dan *Escherichia coli*. *Organisms*, 1(2).
 27. Selvia, C. A. (2012). Pengaruh Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia mangostana* L.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Vibrio cholerae*. *Journal UMM*, 8(2).
 28. Pangestuti, T. I., Wahyono, D., & Nuryastuti, T. (2020). Hubungan Antara Kesesuaian Pemberian Antibiotik Berdasarkan *Guideline* Terhadap *Clinical Outcome* pada Pasien Dewasa dengan Infeksi MRSA (*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*) di Rawat Inap RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta. *Majalah Farmaseutik*, 16(1), 50. <https://doi.org/10.22146/farmaseutik.v16i1.48051>
 29. Misna, M., & Diana, K. (2016). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Bawang Merah (*Allium cepa* L.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Farmasi Galenika (Galenika Journal of Pharmacy)*, 2(2), 138–144.
 30. Rawat, P., Singh, P. K., & Kumar, V. (2017). *Evidence-Based Traditional Anti-Diarrheal Medicinal Plants and Their Phytocompounds*. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 96.
 31. Mahmood, N., Nazir, R., Khan, M., Khaliq, A., Adnan, M., & Ullah, M. (2019). *Antibacterial Activities, Phytochemical Screening and Metal Analysis of Medicinal Plants: Traditional Recipes Used Against Diarrhea*. *Antibiotics*, 8(194), 1–16.
 32. Eni, P., Setyo W. N., & Rusdin, R. (2009). Respon Hambatan Bakteri Gram Positif dan Negatif pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) yang Diawetkan dengan Ekstrak Jahe (*Zingiber officinale*). *Jurnal Kesehatan*, 2(1).