

## Uji In Vitro Efek Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao*) sebagai Antibakteri terhadap *Propionibacterium acnes*

### (In Vitro Test of the Effect of Cocoa Beans (*Theobroma cacao*) Ethanolic Extract as an Antibacterial against *Propionibacterium acnes*)

Ariska Nur Aida, Enny Suswati, Misnawi  
Fakultas Kedokteran Universitas Jember  
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121  
e-mail: ariskanuraida@gmail.com

#### Abstract

*Acne vulgaris* is a chronic inflammatory disease of the pilosebaceous follicle, characterized by comedones, papules, pustules, cysts and nodules in certain sites of predilection, such as face, neck and back. *Propionibacterium acnes* are the most recognized bacteria as a key factor for the development of acne. The purpose of this research was to identify the antibacterial effect and Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of ethanolic extract of Cocoa beans (*T. cacao*) against the growth of *P. acnes* by in vitro method. Antibacterial activity was measured by disk diffusion (Kirby Bauer) method. This was a quasi-experimental with posttest only control group design. Samples used was colony of *P. acnes*. Concentration of test solution used was 7.81; 15.62; 31.25; 62.50; 125; 250; 500; and 1000 mg/ml. Positive control used clindamycin suspension and negative control used sterile distilled water. By direct measurement, MIC was obtained at the dose of 31.25 mg/ml, by using linier regrestion statistical analysis, the quantitaf MIC showed at the dose of 16.93 mg/ml. Analysis using ANOVA showed significance value  $p=0.000$  ( $p<0.05$ ). In conclusion, ethanolic extract of Cocoa beans had an antibacterial effect on *P. acnes* by in vitro method.

**Keywords:** antibacterial effect, cocoa beans, *Propionibacterium acnes*

#### Abstrak

*Acne vulgaris* adalah penyakit peradangan kronik folikel pilosebacea yang ditandai dengan munculnya komedo, papul, pustul, kista, dan nodul, yang sering terjadi pada wajah, leher, dan punggung. *Propionibacterium acnes* merupakan organisme utama yang memberi kontribusi terhadap terjadinya acne. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya efek antibakteri dan Kadar Hambat Minimal (KHM) dari ekstrak etanol biji kakao terhadap pertumbuhan *P. acnes* 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. acnes* dengan konsentrasi larutan uji : 7,81; 15,62; 31,25; 62,50; 125; 250; 500; dan 1000 mg/ml. Kontrol positif menggunakan suspensi clindamycin dan kontrol negatifnya aquadest steril. Hasil KHM secara kualitatif pada konsentrasi 31,25 mg/ml dan dengan analisis statistik uji regresi linier menunjukkan hasil 16,93 mg/ml. Hasil uji ANOVA menunjukkan nilai signifikansi sebesar  $p=0,000$  ( $p<0,05$ ). Dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol biji kakao mempunyai efek sebagai antibakteri terhadap *P. acnes* secara in vitro.

**Kata kunci:** efek antibakteri, biji kakao, *Propionibacterium acnes*

## Pendahuluan

Jerawat atau *acne vulgaris* adalah penyakit peradangan kronik folikel pilosebacea yang ditandai dengan munculnya komedo, papula, pustul, dan nodul [1]. Jerawat terjadi pada kulit yang banyak mengandung kelenjar sebacea seperti muka, dada, dan punggung [2].

Prevalensi jerawat di Indonesia cukup tinggi, yaitu berkisar antara 85-100% orang, sedangkan menurut catatan kelompok studi dermatologi kosmetika Indonesia, menunjukkan terdapat 60% penderita jerawat pada tahun 2006 dan 80% pada tahun 2007 [3]. *Propionibacterium acnes* merupakan organisme utama yang pada umumnya memberi kontribusi terhadap terjadinya jerawat. *P. acnes* termasuk dalam kelompok bakteri Gram positif yang berbentuk batang dan tidak berspora [4].

Antibiotik sudah secara luas digunakan sebagai salah satu cara efektif dalam pengobatan *acne vulgaris* selama 30 tahun terakhir. Saat ini, *clindamycin* adalah salah satu antibiotik yang paling sering digunakan dalam pengobatan *acne vulgaris*. Tetapi, penggunaannya yang secara luas, memunculkan strain *P. acnes* yang resisten terhadap *clindamycin* [2]. Akibatnya penggunaan *clindamycin* sebagai anti *acne* jangka panjang mulai diragukan, oleh karena itu diperlukan terapi alternatif dengan memanfaatkan zat aktif dari tumbuhan yang mempunyai potensi tinggi sebagai antibakteri. Pada penelitian terdahulu telah membuktikan bahwa senyawa polifenol dalam ekstrak etanol biji kakao dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. pneumoniae* dan *P. aeruginosa* yang dilakukan dengan metode *in vitro* [5,6].

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek antibakteri dan mengetahui Kadar Hambat Minimal (KHM) dari ekstrak etanol biji kakao terhadap bakteri *P. acnes* 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*) [7]. Sampel yang digunakan adalah koloni bakteri *P. acnes* yang disesuaikan dengan standar 0,5 Mc Farland. Kontrol positif dengan suspensi *clindamycin* 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. acnes*. Variabel terkendali 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.

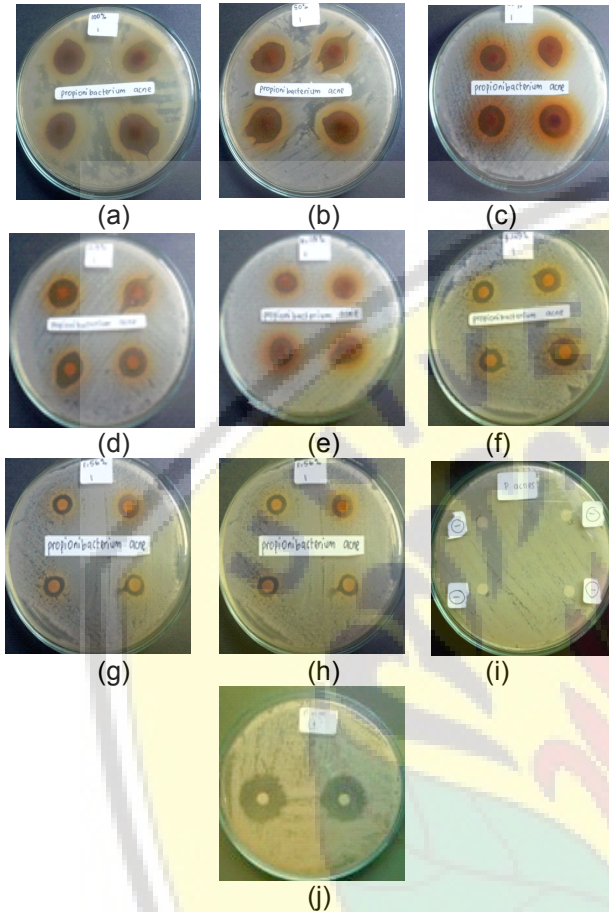
Prosedur penelitian dilakukan dengan pembuatan konsentrasi ekstrak etanol biji kakao. Timbang 4000 mg ekstrak etanol biji kakao lalu campur dengan 4 ml aquades steril pada vial I. Vial I setara dengan konsentrasi 1000 mg/ml. Dari vial I diambil sebanyak 2 ml dimasukkan ke dalam vial II yang sudah diisi 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 [8]. 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<sup>0</sup> C lalu amati dan hitung zona hambat dengan jangka sorong untuk menentukan nilai KHM. Dengan metode yang sama, sebagai kontrol positif menggunakan bubuk antibiotik *clindamycin* yang ditimbang 2 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. acnes* 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 linear 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 pengamatan dengan 4 kali pengulangan dari aktivitas antibakteri ekstrak etanol biji kakao (*T. cacao*) terhadap pertumbuhan *P. acnes*, diketahui zona hambat

mulai terbentuk pada konsentrasi 7,81 mg/ml hingga konsentrasi 1000 mg/ml. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol biji kakao (*T. cacao*) mempunyai efek sebagai antibakteri terhadap *P. acnes*, seperti yang dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Zona Hambat Berbagai Tingkat Konsentrasi Ekstrak Etanol Biji Kakao (*T. cacao*), kontrol negatif, dan kontrol positif terhadap Pertumbuhan *P. acnes*.

- Ket: 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 15,26 mg/ml  
 h : konsentrasi 7,81 mg/ml  
 i : kontrol negatif  
 j : kontrol positif

Daya antibakteri ekstrak etanol biji kakao dapat ditentukan dengan menetapkan nilai *breakpoint*. Nilai *breakpoint* merupakan nilai batas dimana suatu bakteri dinyatakan

sensitif atau resisten. Pada penelitian ini nilai *breakpoint* yang ditetapkan adalah 10 mm. Secara umum, apabila diameter zona hambat  $\geq 10$  mm, maka bakteri dinyatakan sensitif terhadap suatu ekstrak dan apabila diameter zona hambat  $< 10$  mm, bakteri dinyatakan resisten [9], seperti yang dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil interpretasi pembacaan daya penghambat oleh berbagai konsentrasi ekstrak etanol biji kakao (*T. cacao*) terhadap pertumbuhan *P. acnes*.

Serial Konsentrasi (mg/ml)	Diameter Zona Hambat (mm)				Rata-rata	Interpretasi
	Pengulangan					
	I	II	III	IV		
K (-)	5*	5*	5*	5*	5*	Resisten
7,81	7,50	7,50	8,00	6,80	7,50	Resisten
15,26	9,50	9,60	9,10	9,20	9,40	Resisten
31,25	9,80	10,70	10,10	12,00	10,70	Sensitif
62,50	11,50	13,40	12,40	11,90	12,30	Sensitif
125	13,30	13,40	12,50	16,20	13,90	Sensitif
250	12,70	13,00	13,60	19,50	14,70	Sensitif
500	17,50	17,80	15,60	15,00	16,50	Sensitif
1000	17,20	15,70	17,70	16,70	16,80	Sensitif
K (+)	21,80	19,90	23,40	22,80	21,90	Sensitif

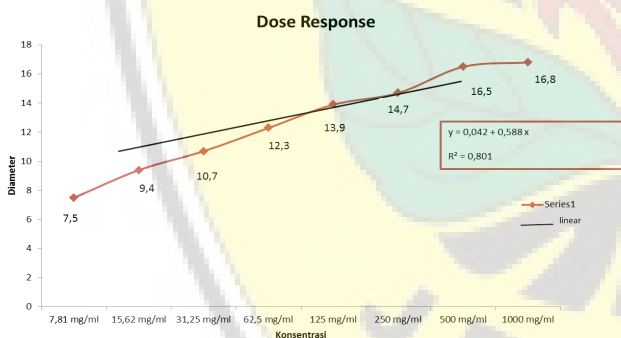
\*tidak terdapat zona bening karena kertas saring berdiameter 5 mm.

Berdasarkan hasil rata-rata zona hambat dari tabel 1, *P. acnes* menunjukkan hasil yang sensitif terhadap ekstrak etanol biji kakao pada konsentrasi 31,25 mg/ml sampai konsentrasi 1000 mg/ml, dan resisten terhadap ekstrak etanol biji kakao pada konsentrasi 15,26 mg/ml dan 7,81 mg/ml. Oleh karena itu, KHM *breakpoint* ekstrak etanol biji kakao terhadap pertumbuhan *P. acnes* secara kualitatif adalah pada konsentrasi 31,25 mg/ml.

Hasil uji normalitas *Shapiro Wilk* menunjukkan data terdistribusi normal karena didapatkan nilai  $p = 0,119$  ( $p > 0,05$ ). 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. acnes*). Besar korelasi yaitu 0,931

menyatakan arah korelasi bersifat positif dan keeratan hubungan sangat kuat. Artinya, semakin tinggi konsentrasi (X) maka diameter zona hambat yang terbentuk (Y) cenderung semakin lebar.

Uji regresi linear menunjukkan adanya pengaruh variabel terikat terhadap variabel bebas. Persamaan garis regresi yang terbentuk adalah  $Y = 0,042 + 0,588X$ , seperti yang terlihat pada gambar 2. Dari persamaan garis regresi ini dapat diketahui KHM *breakpoint* kuantitatif, dengan memasukkan nilai  $Y = 10$  sehingga didapatkan nilai  $X = 16,93$ . Hal ini berarti pada konsentrasi 16,93 mg/ml ekstrak etanol biji kakao mulai mampu menghambat pertumbuhan *P. acnes* secara efektif. Pada uji regresi juga didapatkan koefisien determinasi ( $R^2$ ) sebesar 0,801 yang artinya sebesar 80 % keragaman pertumbuhan *P. acnes* ditentukan oleh besarnya konsentrasi ekstrak etanol biji kakao, sedangkan 20 % sisanya disebabkan oleh faktor lain. Pada uji hipotesis *One Way Anova* yang dilakukan pada masing-masing kelompok, didapatkan perbedaan yang bermakna dengan nilai signifikansi sebesar  $p=0,000$  ( $p<0,05$ ).



Gambar 2. Grafik Pengaruh Ekstrak Etanol Biji Kakao terhadap Diameter Zona Hambat Pertumbuhan *P. acnes*

### Pembahasan

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

Pada kertas saring yang menyerap aquadest sebagai kontrol negatif tidak terbentuk zona hambat karena aquadest tidak memiliki kemampuan antibakteri. Pada kertas saring yang menyerap larutan *clindamycin* sebagai kontrol positif terdapat zona hambat. Hal ini mengindikasikan bahwa sampel bakteri yang digunakan adalah bakteri yang masih hidup dan sensitif terhadap *clindamycin*. *Clindamycin* dipilih sebagai kontrol positif karena *clindamycin* merupakan suatu pilihan terapi sistemik yang efektif pada acne. Mekanisme kerja *clindamycin* yaitu menghambat sintesis protein dari mikroba dengan cara terikat pada subunit 50S [10].

Diketahui bahwa *P. acnes* sensitif terhadap ekstrak etanol biji kakao pada konsentrasi 31,25 mg/ml sampai konsentrasi 1000 mg/ml. Penurunan diameter zona hambat pertumbuhan *P. acnes* seiring dengan penurunan konsentrasi ekstrak etanol biji kakao, hal ini terjadi karena pada pengenceran bertingkat ekstrak etanol biji kakao terjadi pengurangan zat aktif dari ekstrak etanol biji kakao sehingga efek antibakterinya pun berkurang.

Ekstrak etanol biji kakao memiliki efek sebagai antibakteri karena mengandung senyawa polifenol seperti flavonoid, katekin, dan tannin. Flavonoid memiliki aktivitas antibakteri melalui hambatan fungsi DNA *gyrase* sehingga kemampuan replikasi bakteri dihambat. Senyawa ini akan melakukan kontak dengan DNA pada inti sel bakteri. Adanya perbedaan kepolaran antara lipid penyusun DNA dengan gugus alkohol pada senyawa flavonoid menyebabkan kerusakan struktur lipid DNA bakteri sehingga bakteri akan lisis dan mati [11]. Katekin dapat merusak membran sitoplasma yang menyebabkan bocornya metabolit penting yang menginaktivasi sistem enzim bakteri [12]. 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 [11].

### Simpulan dan Saran

Ekstrak etanol biji kakao (*T. cacao*) mempunyai efek antibakteri terhadap

pertumbuhan *P. acnes* secara *in vitro*. Konsentrasi minimum ekstrak etanol biji kakao (*T. cacao*) yang mampu menghambat pertumbuhan *P. acnes* secara kualitatif adalah 31,25 mg/ml dan secara kuantitatif di atas 16,93 mg/ml.

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

#### Daftar Pustaka

- [1] Kumar BHA, Sachidanand. Treatment of Acne Vulgaris with New Polyherbal Formulations, Clarina Cream, and Purim Tablets. *Dermatology*. 2001; 46(3): 138-141.
- [2] Nugroho RN. Terapi Topikal *Clindamycin* Dibandingkan dengan Niacinamide dan Zinc pada Acne Vulgaris. Semarang: Universitas Diponegoro; 2013.
- [3] Aziz NA. Pengaruh Cara dan Kebiasaan Membersihkan Wajah terhadap Pertumbuhan Jerawat. Medan: Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara; 2010.
- [4] Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. Mikrobiologi Kedokteran. Edisi 25. Jakarta: EGC; 2012.
- [5] Kumalasari DC. Efek Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao*) sebagai Antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* secara *In Vitro*. Jember: Fakultas Kedokteran Universitas Jember; 2014.
- [6] Wrahatnala BJ. Efek Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao*) sebagai Antibakteri terhadap *Streptococcus pneumoniae* secara *In Vitro*. Jember: Fakultas Kedokteran Universitas Jember; 2014.
- [7] Praktiknya AW. Dasar-dasar Metodologi Penelitian Kedokteran dan Kesehatan. Jakarta: PT. Raja Grafindo Perkasa; 2008.
- [8] Suswati E, Mufida D. Petunjuk Praktikum Mikrobiologi Kedokteran dan Kesehatan. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember; 2009.
- [9] Bell SM, Pham, Nguyen. Antibiotic Susceptibility Testing By The Cds Method Sixth Edition. Australia: Department Of Microbiology, South Eastern Area Laboratory Services; 2012.
- [10] Setiabudy R. Farmakologi dan Terapi: Pengantar Antimikroba. Edisi Kelima. Jakarta: Universitas Indonesia; 2011.
- [11] Wulandari P, Suswati E, Misnawi, Rianul A. Efek Antibakteri Ekstrak Etanol Biji Kakao (*T. cacao*) terhadap Pertumbuhan *Shigella Dysenteriae* secara *In Vitro*. *Jurnal Medika Planta*. 2012; 1(5): 67-75.
- [12] Susanti A. Daya Antibakteri Ekstrak Etanol daun Beluntas (*Plutchea indica less*) terhadap *Escherichia coli* secara *in vitro*. Surabaya: Universitas Airlangga; 2011.