

Pemanfaatan Limbah Ekstrak Metanol Dari Kulit Buah Kakao (*Theobroma Cacao* L.) Sebagai Antimikroba

Vriezka Mierza^{1,*}, Mariany Razali¹, Muhammad Hanafi², Martina Pandiangan²

¹ Fakultas Biologi, Program Farmasi, Universitas Tjut Nyak Dhien, Medan, Indonesia.

² Fakultas Farmasi, Program Farmasi, Universitas Tjut Nyak Dhien, Medan, Indonesia.

Jl. Rasmi No, 28 Sei Sikambing C. II, Kec. Medan Helvetia, Medan, Sumatra Utara, 20123, Indonesia

Email: ^{1,*}vriezka.mierza@fikes.unsika.ac.id, ²marianyrazali@gmail.com, ³mhdhanafi009@gmail.com, ⁴tinapandiangan5@gmail.com.

Email Penulis Korespondensi: vriezka.mierza@fikes.unsika.ac.id

Abstrak—Mikroorganisme, yang meliputi bakteri, jamur, virus, dan parasit, adalah kelas besar organisme mikroskopis dengan satu atau lebih sel. Diantaranya adalah *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis* dan *Streptococcus pyogenes*. Salah satu jenis tanaman yang memiliki manfaat bagi kesehatan adalah tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) yang termasuk dalam suku *Malvaceae*. Pada dasarnya masyarakat hanya menggunakan bagian buah coklat dan bijinya saja sehingga kulitnya dibuang begitu saja tanpa ada pengolahan secara khusus apabila tidak ditanganin secara baik maka dapat menimbulkan berbagai macam keburukan salah satunya penyakit yang dapat mengakibatkan kematian. Pada penelitian ini ekstrak metanol kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) dibuat sebagai uji daya hambat terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis*, dan *Staphylococcus epidermidis* kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan bahan uji yang digunakan dalam metodologi eksperimental penelitian ini, preparasi simplisia, ekstraksi maserasi pelarut etanol, pengujian aktivitas antibakteri metode difusi agar dan skrining fitokimia untuk analisis komponen senyawa kimia merupakan bagian dari tahapan penelitian ini. Pengeringan kulit buah kakao menghasilkan 26,5 kg simplisia dan maserasi dengan etanol menghasilkan 14,41 g ekstrak kental, aktivitas antibakteri ekstrak etanol maserasi kulit buah kakao ditunjukkan dengan daya hambat terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes* sebesar 21 mm, bakteri *Bacillus subtilis* sebesar 68 mm, bakteri *Bacillus subtilis* sebesar 14,06 mm, bakteri *Proteus mirabilis* sebesar 14,4 mm dan bakteri *Staphylococcus epidermidis* pada konsentrasi 100 mg/ml. Hasil skrining fitokimia ekstrak etanol kulit buah kakao menunjukkan adanya kandungan glikosida antraquinon, senyawa kimia flavonoid, triterpenoid, tanin dan saponin.

Kata Kunci: kulit buah Kakao (*Theobroma cacao* L); skrining fitokimia; ekstrak etanol; Bakteri *Streptococcus pyogenes*; *Bacillus subtilis*; *Proteus mirabilis* dan *Staphylococcus epidermidis*.

Abstract—Microorganisms, which include bacteria, fungi, viruses, and parasites, are a large class of microscopic organisms with one or more cells. Among them are *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis*, and *Streptococcus pyogenes*. One type of plant that has health benefits is the cocoa plant (*Theobroma cacao* L.) which belongs to the *Malvaceae* tribe. In this study, methanol extract of cocoa fruit peel (*Theobroma cacao* L.) was made as an inhibition test against *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis*, and *Staphylococcus epidermidis* bacteria. Cocoa pod peel (*Theobroma cacao* L.) was the test material used in the experimental methodology of this study. Simplisia preparation, ethanol solvent maceration extraction, agar diffusion method antibacterial activity testing, and phytochemical screening for chemical compound component analysis are part of the stages of this research. Drying of cocoa fruit peels produced 26.5 kg of simplisia, and maceration with ethanol produced 14.41 g of thick extract. Antibacterial activity of ethanol macerated extract of cocoa fruit peel was shown by inhibition against *Streptococcus pyogenes* bacteria by 21 mm, *Bacillus subtilis* bacteria by 68 mm, *Bacillus subtilis* bacteria by 14.06 mm, *Proteus mirabilis* bacteria by 14.4 mm, and *Staphylococcus epidermidis* bacteria at a concentration of 100 mg/ml. The results of phytochemical screening of ethanol extract of cocoa pod skin showed the presence of anthraquinone glycosides, flavonoid chemical compounds, triterpenoids, tannins, and saponins.

Keywords: kulit buah Cocoa (*Theobroma cacao* L); screening phytochemicals; ethanol extract; Bacteria *Streptococcus pyogenes*; *Bacillus subtilis*; *Proteus mirabilis* dan *Staphylococcus epidermidis*.

1. PENDAHULUAN

Negara maju maupun negara berkembang, penyakit infeksi merupakan ancaman bagi kesehatan global mikroba yang paling sering menyebabkan infeksi adalah bakteri. Antibiotik dapat digunakan untuk melawan infeksi tetapi penggunaannya sering kali mengakibatkan resistensi. Infeksi oleh bakteri yang resisten terhadap antibiotik dapat berbahaya karena dapat berdampak pada hasil pengobatan, biaya, penyebaran penyakit dan durasi penyakit. *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes* dan *Staphylococcus epidermidis* adalah contoh flora yang dapat berubah menjadi patogen jika perkembangbiakannya berlebihan (Matandung et al., 2024).

Antimikroba dapat menyebabkan gangguan infeksi pada manusia. *Proteus mirabilis* merupakan bakteri gram negatif yang dapat menyebabkan infeksi kulit dan saluran kemih (Nisak & Rini, 2021). Antibiotik dapat digunakan untuk mengobati penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Proteus mirabilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis* dan *Staphylococcus epidermidis* adalah bakteri yang paling sering menginfeksi manusia terutama pada kulit karena penggunaan antibiotik yang tidak tepat banyak mikroorganisme penyebab penyakit pada manusia (patogen) telah mengembangkan resistensi terhadap obat (Mustofa & Adilla, 2024). Bakteri *Staphylococcus epidermidis* secara historis terbukti resisten terhadap obat metisilin dan penisilin (Mopangga et al., 2021).

Bakteri *Staphylococcus epidermidis* adalah bakteri yang dapat menyebabkan infeksi pada kulit manusia, sistem pernapasan dan sistem pencernaan semuanya mengandung bakteri ini dapat menyebabkan infeksi ginjal, infeksi saluran kemih, infeksi luka dan pembengkakan yang mirip dengan jerawat. Selain itu, bakteri ini merupakan penyebab utama sepsis pada bayi baru lahir dan peritonitis pada pasien gagal ginjal yang menjalani dialisis peritoneal berbantuan

kateter (Adriana et al., 2023). Koloni putih atau kuning anaerob fakultatif bakteri *Staphylococcus epidermidis* adalah bakteri Gram positif infeksi kronis pada manusia dapat disebabkan oleh *Staphylococcus epidermidis* biotipe-1.

Zat kimia atau biologis yang dikenal sebagai “antimikroba” digunakan untuk menghentikan penyebaran bakteri dan jamur serta membasminya. Resistensi antimikroba dapat diakibatkan oleh penggunaan antibiotik yang berlebihan dan tidak rasional. Antimikroba umumnya bekerja dengan mencegah produksi dinding sel bakteri memecah integritas membran sel bakteri, mencegah sintesis asam nukleat sel bakteri dan mencegah sintesis protein sel bakteri (Ariyana et al., 2021). Masalah mikroorganisme yang kebal terhadap antibiotik merupakan masalah utama dalam bidang medis. Menurut data dari *Cancer For Disease Prevention* penyakit akibat bakteri resisten telah merenggut nyawa 13.300 orang. Orang-orang yang mengalami konsekuensi negatif dari resistensi antibiotik saat ini mencari pengganti produk alami. Banyak senyawa antimikroba yang ditemukan pada tanaman dapat digunakan untuk mengobati berbagai gangguan infeksi yang disebabkan oleh bakteri dan jamur.

Negara tropis Indonesia adalah rumah bagi berbagai macam tanaman termasuk perkebunan, pertanian dan hasil hutan. Tanaman kakao merupakan salah satu tanaman yang secara empiris telah terbukti memiliki khasiat, sebagai obat, kulit buah, daging buah, keping biji dan plasenta merupakan bagian dari buah kakao. Kulit buah kakao merupakan bagian terbesar dari buah kakao dibuang dan mencemari lingkungan sedangkan bijinya digunakan dalam bisnis pengolahan kakao. Oleh karena itu pengolahan lebih lanjut diperlukan untuk memaksimalkan penggunaan buah kakao (Rina Amelia, Slamet Triyadi, 2023).

Pemanfaatan kulit buah kakao sebagai kontrol alternatif untuk menghentikan pertumbuhan bakteri yang menyebabkan penyakit infeksi dapat dilakukan. Kandungan kimia alkaloid, flavonoid, tanin dan saponin merupakan beberapa komponen kimia yang cukup kompleks pada kulit buah kakao yang kemungkinan memiliki sifat antibakteri (Adha & Ibrahim, 2021). Tahap awal dalam mencari bahan aktif terapeutik dalam tanaman adalah ekstraksi. A) komponen tanaman yang digunakan, B) pelarut ekstraksi dan C) teknologi ekstraksi merupakan faktor fundamental yang mempengaruhi kualitas ekstrak. Suhu periode ekstraksi dan jenis ekstraksi adalah beberapa contoh perbedaan teknik ekstraksi jumlah dan susunan metabolit sekunder dari ekstrak juga akan tergantung pada polaritas, jenis serta jumlah pelarut. (Ridwan et al., 2020). Melakukan beberapa penelitian yang paling ekstensif tentang potensi ekstrak kulit buah kakao. Mereka menemukan bahwa kulit buah kakao jenis lindak (*forastero*) digunakan sebagai bahan antibakteri terhadap *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis* dan *Staphylococcus epidermidis* yang memiliki konsentrasi hambat minimum (KHM) masing-masing 16% (g/mL), 32% (g/mL), dan 8% (g/mL), konsentrasi ekstrak kulit buah kakao yang paling efektif menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.

Penelitian-penelitian tersebut menjadi awal data pendukung penelitian selanjutnya karena diketahui ternyata kulit buah Kakao mengandung senyawa kimia yang dapat bersifat sebagai antimikroba. Berdasarkan uraian diatas peneliti akan melakukan uji aktivitas ekstrak metanol kulit buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis* dan *Staphylococcus epidermidis*.

2. METODE PENELITIAN

2.1. Kerangka Pikir

Metode deskriptif dan eksperimental digunakan dalam penelitian ini dalam pemilihan sampel digunakan metode purposif tidak membandingkan tanaman ini dengan daerah lain kemudian adapun tahapan dalam penelitian dimulai dari pengujian meliputi skrining fitokimia, pengujian antibakteri terhadap *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis* dan *Staphylococcus epidermidis*, serta determinasi di “Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI)”.

2.2. Alat Dan Bahan Yang Digunakan Dalam Penelitian

Alat – alat yang digunakan dalam penelitian ini gelas laboratorium (Pyrex®), autoklaf, blender kaca (Miyako®), corong pisah, etiket, inkubator (Mettler®), jangka sorong, kamera hp (Vivo®), kompor gas (Rinnai®), lemari pendingin (Panasonic®), lemari pengering, neraca analitik (Vibra AJ®), oven (Mettler®), pecadang logam, penangas air, perkolator, pH meter (MColorpHast®) spuult (One med®) dan vortex mixer (K®) serta bahan yang digunakan berupa kulit buah kakao, akuades, alfa naftol (Merck®), amoniak (Merck®), asam asetat anhidrida (Merck®), asam klorida (Merck®), asam nitrat (Merck®), asam pikrat (Merck®), asam sulfat (Merck®), benzen (Merck®), besi (III) klorida (Merck®), bismut (III) nitrat (Merck®), Bouchardat (Merck®), dietileter (Merck®), dimetil sulfoksida (Merck®), Dragendorf (Merck®), etanol (Merck®), etilasetat (Smart-lab®), Fehling A (Merck®), Fehling B (Merck®), heksana (Smart-lab®), isopropanol (Merck®), kloramfenikol (Merck®), kloroform (Merck®), magnesium (Merck®), Mayer (Merck®), Mc. Farland (Merck®), metanol (Smart-lab®), Mueller Hinton Agar (Himedia®), Mueller Hinton Broth (Himedia®), molish (Merck®), natrium hidroksida (Merck®), natrium karbonat (Merck®), natrium sulfat anhidrat (Merck®), natrium pikrat (Merck®), natrium tiosulfat (Merck®), nistatin (Merck®), Nutrient Agar (Himedia®), petroleum eter (Merck®), raksa (II) klorida (Merck®), Sabaroud Dextrose Agar (Merck®), Sabaroud Dextrose Broth (Merck®), timbal (II) asetat (Merck®) dan zinkum (Merck®). Kultur jamur dan bakteri murni yang digunakan adalah *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis* dan *Staphylococcus epidermidis*.

2.3. Pembuatan Pereaksi

2.3.1. Asam Klorida 2N

Sebanyak 16,67 ml asam klorida pekat diencerkan dengan akuades hingga volume 100 ml (Mierza et al., 2021).

2.3.2. Besi (III) klorida 5%

Sebanyak 5 g besi (III) klorida dilarutkan sedikit demi sedikit di dalam asam klorida 0,5 N hingga semua bahan larut kemudian volume dicukupkan hingga 100 ml (Saputri & Mierza, 2020).

2.3.3. Dragendorff

Sebanyak 1,7 g bismut (III) nitrat dilarutkan sedikit demi sedikit dalam asam asetat glasial dan 80 ml akuades (larutan 1). Pada wadah lain ditimbang sebanyak 40 g kalium iodida lalu dilarutkan dalam 100 ml akuades dan 200 ml asam asetat glasial. Kemudian kedua larutan dicampurkan dan didiamkan sampai memisah sempurna. Larutan yang jernih diambil dan diencerkan dengan akuades sampai 1000 ml (BR PA et al., 2022).

2.3.4. Timbal (II) Asetat 0,4 M

Sebanyak 15,17 g timbal asetat dilarutkan sedikit demi sedikit dalam akuades bebas CO₂ hingga volume 100 ml (Saputri & Mierza, 2020).

2.4. Pembuatan Simplisia

Sebanyak 26,5 kg kulit buah kakao segar diperoleh dari 40,25 kg buah kakao segar. Sampel buah kakao dikumpulkan terlebih dahulu, kemudian dilakukan sortasi basah, dilanjutkan dengan pencucian dengan air mengalir, penirisan dan pemisahan biji kakao dari kulitnya, dan terakhir dilakukan penimbangan kulit buah kakao segar. Setelah itu, kulit buah kakao diiris tipis-tipis, dijemur di bawah sinar matahari selama kurang lebih satu hari, kemudian dijemur selama satu hari penuh. Setelah itu, kulit buah kakao dimasukkan ke dalam lemari pengering dengan suhu 40 hingga 50 derajat Celcius hingga kering dan tidak mudah pecah. Untuk menghasilkan kulit buah kakao, kulit buah kakao yang sudah kering disortir kemudian dihaluskan dengan blender hingga menjadi serbuk simplisia, setelah itu ditimbang dan disimpan dalam wadah yang tertutup rapat (Febriani et al., 2024).

2.5. Pembuatan Ekstrak

Sebanyak 300 gram serbuk simplisia kulit buah kakao diekstraksi dengan cara perkolasi dengan pelarut metanol, setelah proses maserasi selama 24 jam, menghasilkan 14,41 gram ekstrak kental metanol. Pada tanaman pelarut metanol memiliki kemampuan untuk menarik zat-zat yang bersifat polar, semi polar dan non polar. Karena sampel telah terpisah dari ekstrak metode perkolasi memiliki kelebihan yaitu tidak memerlukan langkah tambahan dan tidak ada kejenuhan. Di sisi lain metode ini memiliki kekurangan yaitu membutuhkan pelarut dalam jumlah besar dan pelarut menjadi dingin selama proses perkolasi sehingga komponen tidak dapat terlarut secara efektif. Aktivitas antibakteri dari ekstrak metanol yang dihasilkan diperiksa (Zebua et al., 2023).

2.6. Sterilisasi

Untuk mencegah mikroorganisme mencemari instrumen dan bahan yang digunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri, semua benda ini harus didesinfeksi sebelum digunakan. Semua instrumen dan bahan yang tidak bersifat kuantitatif dan tahan panas tinggi didesinfeksi selama satu jam pada suhu 170 derajat Celcius di dalam oven. Semua instrumen dan perlengkapan yang tidak bersifat kuantitatif dan tahan panas tinggi disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 derajat Celcius. Sebelum dan sesudah digunakan, alat ose disanitasi dengan menggunakan api Bunsen. Alat-alat yang telah digunakan, baik yang digunakan kembali pada saat uji aktivitas antibakteri maupun tidak, harus segera dibuang dengan cara merebusnya selama 30 menit di dalam panci yang berisi air dan larutan desinfektan (Sudewi, 2023).

2.7. Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Metanol Kulit Buah Kakao

Timbang 1 gram ekstrak metanol biji kakao dan pindahkan ke dalam botol steril berukuran 10 ml yang telah dikalibrasi. Selanjutnya, larutkan secara bertahap dengan dimetil sulfoksida (perhatikan berapa banyak dimetil sulfoksida yang dibutuhkan untuk melarutkan 1 g ekstrak). Satu gram ekstrak dilarutkan dalam lima mililiter dimetil sulfoksida dan ekstrak kemudian diencerkan dengan etanol hingga mencapai tanda batas kalibrasi (catat berapa banyak etanol yang dibutuhkan untuk mengencerkan ekstrak hingga tanda batas kalibrasi). Empat mililiter etanol diperlukan untuk mengencerkan ekstrak ke titik batas kalibrasi. Dalam hal ini, rasio etanol terhadap dimetil sulfoksida adalah 5:4. Konsentrasi 100 mg/ml kemudian tercapai. Setelah itu dilakukan pengenceran untuk mendapatkan konsentrasi 50 mg/ml; 25 mg/ml; 12,5 mg/ml; 6,25 mg/ml.

2.8. Pembuatan Larutan Uji Blanko Negatif

Campuran etanol dan dimetil sulfoksida dengan rasio jumlah yang tepat-dimetil sulfoksida: etanol 5:4 digunakan sebagai larutan blanko negatif untuk melarutkan ekstrak. Diperlukan 12 mililiter etanol dan 15 mililiter dimetil sulfoksida untuk membuat larutan blanko negatif 27 mililiter dalam wadah tertutup rapat campurkan etanol dan dimetil sulfoksida. Nama

blanko negatif dan rasio etanol terhadap dimetil sulfoksida kemudian diberikan sebagai bagian dari etiket (Prasetyo, 2021).

2.9. Pembuatan larutan uji blanko positif

Sebagai baku pembanding/blanko positif untuk uji bakteri digunakan kloramfenikol kapsul. Timbang 0,5 mg serbuk kloramfenikol ke dalam labu tentukur 100 ml. Larutkan dengan akuades steril hingga tanda batas yang tertera pada labu tentukur. Kemudian beri etiket yang tercantum nama blanko positif serta konsentrasinya (Prasetyo, 2021).

2.10. Pembuatan Media Agar Miring/peremajaan

Tujuan pembuatan media agar miring adalah sebagai media pembaharuan pertumbuhan bakteri media agar miring dibuat dari media nutrient agar untuk mikroorganisme. Lima mililiter media Nutrient Agar steril dimasukkan secara aseptik ke dalam tabung reaksi steril didiamkan pada suhu ruang hingga membeku pada sudut 45 derajat kemudian tabung diberi tulisan yang berisi nama media dan tanggal pembuatan sebelum digunakan media agar miring disimpan di dalam lemari es (Indarto et al., 2019).

2.11. Peremajaan Bakteri

Streptococcus pyogenes gram negatif, *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis*, dan *Staphylococcus epidermidis* adalah kultur bakteri murni yang digunakan. Untuk menguji aktivitas antibiotik kultur bakteri disimpan dalam inkubator pada suhu $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ dan diisi ulang setiap dua hari. Sekali sebulan kultur bakteri yang tidak digunakan untuk menilai aktivitas antimikroba diisi ulang dan disimpan dalam lemari es. Melalui proses berikut peremajaan bakteri dilakukan untuk memastikan bahwa sel bakteri memiliki nutrisi yang cukup untuk pertumbuhan yang optimal. Wadah diberi etiket yang mencakup nama bakteri dan tanggal peremajaan setelah satu siklus kultur bakteri dikeluarkan menggunakan keranjang steril dan digores pada media agar miring. Untuk menguji aktivitas antibakteri kultur bakteri uji disimpan dalam inkubator selama 18–24 jam pada suhu $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ (Indarto et al., 2019).

2.12. Pembuatan Inokulum Bakteri

Koloni bakteri diambil dari stok kultur peremajaan bakteri dengan jarum ose steril lalu disuspensikan dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml larutan *Mueller Hinton Broth*, kemudian di vortex lalu diinkubasi pada suhu $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 18-24 jam. Setelah 24 jam larutan suspensi inokulum dan larutan standart *McFarland* di vortex dan diukur kembali kekeruhannya dengan larutan standart *McFarland* (Husniah & Gunata, 2020).

2.13. Penentuan Diameter Zona Hambat Pada *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis* dan *Staphylococcus epidermidis*

Isi cawan petri steril dengan 10 mililiter *Mueller Hinton Agar*, kemudian biarkan hingga mengeras. Setelah menambahkan 25 ml media *Mueller Hinton Agar* dan 0,1 ml suspensi bakteri, campuran dihomogenkan, penyangga logam dimasukkan, dan campuran dibiarkan memadat. Angkat penyangga logam hingga terbentuk lubang berbentuk sumur setelah media memadat. Selanjutnya, 0,1 ml larutan uji diteteskan ke setiap sumur dengan konsentrasi yang berbeda: 100 mg/ml, 50 mg/ml, 25 mg/ml, 12,5 mg/ml, dan 6,25 mg/ml. Penyangga logam meliputi campuran etanol dan dimetil sulfoksida dengan perbandingan 5:4 sebagai kontrol negatif, kemudian disimpan selama 18 hingga 24 jam pada suhu $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ dalam inkubator. Selanjutnya, ruang terbuka di sekitar diameter resistansi permukaan bakteri yang diuji ditentukan dengan mengukur lubang yang mengelilingi sumur dengan jangka sorong (Husniah & Gunata, 2020).

2.14. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan terhadap ekstrak metanol kulit buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) yang meliputi pemeriksaan alkaloid, antrakinon glikosida, flavonoid, glikosida, saponin, sianogenik glikosida, steroid/triterpenoid dan tanin.

2.14.1. Pengujian Alkaloid

Sebanyak 1 gram ekstrak metanol dimasukkan ke erlenmeyer, ditambahkan etanol hingga terendam lalu diaduk, ditambahkan 5 tetes asam klorida 2 N, sampai asam (cek kertas lakmus), tutup mulut erlenmeyer dengan plastik yang ditusuk-tusuk dan diatasnya diletakkan kapas yang sudah dibasahi dengan akuades lalu panaskan diatas penangas air selama 30 menit, dinginkan dan saring. Filtrat yang diperoleh dipakai untuk pemeriksaan alkoid. Diambil 3 tabung reaksi masing-masing masukkan 1 ml filtrat, beri tanda masing-masing tabung dengan Mayer, Dragendorf dan Bouchardat. Tetesi masing-masing pereaksi sebanyak 3-5 tetes. Alkaloid positif jika terjadi endapan putih pada pereaksi Mayer dan endapan coklat atau kuning cokelat pada pereaksi Dragendorf dan Bouchardat (Mierza, 2020).

Jika belum mendapat hasil maka pada filtrat yang terdapat pada erlenmeyer ditambah amoniak pekat sampai basa (cek kertas lakmus). Masukkan ke dalam corong pisah ditambahkan 20 ml dietileter–kloroform dengan perbandingan 3:1. Larutan digoyangkan sambil dikeluarkan gasnya sesekali sampai gasnya hilang. Diamkan beberapa saat hingga terbentuk 2 lapisan. Ambil lapisan bawah (dietileter–kloroform) tampung dicawan penguap, uapkan diatas penangas air sampai sisa 1/3 dari volume awal. Lalu tambahkan asam klorida 2 N sampai asam. Ambil 1 ml masukkan ke dalam tabung reaksi yang masing-masing telah diberi tanda dengan Mayer, Dragendorf dan Bouchardat. Lalu tetesi masing-masing pereaksi

sebanyak 3-5 tetes. Alkaloid positif jika terjadi endapan putih pada pereaksi Mayer dan endapan coklat atau kuning coklat pada pereaksi Dragendorf dan Bouchardat (Herman et al., 2020).

2.14.2. Uji Flavonoid

Sebanyak 1 gram ekstrak metanol direndam dalam metanol, tambahkan 5 tetes asam klorida 2 N sampai asam (cek kertas lakmus), kemudian tutup mulut erlenmeyer dengan plastik yang telah ditusuk-tusuk dan diatasnya diletakkan kapas yang sudah dibasahi dengan akuades lalu panaskan selama 30 menit. Disaring ketika panas, apabila filtrat berwarna maka perlu diencerkan dengan akuades sampai tidak berwarna. Kemudian filtrat dimasukkan ke corong pisah tambahkan petroleum eter, lalu goyangkan dan keluarkan gasnya sampai gasnya hilang. Didiamkan dan ambil lapisan bawah (metanol). Uapkan dalam cawan penguap pada suhu 40°C lalu dilarutkan dengan etil asetat di saring. Filtratnya dibagi 2 cawan.

Cawan 1 : filtrat 1 ml diuapkan sampai kering lalu dilarutkan dalam 2 ml etanol tambah 0,5 g serbuk zinkum dan 1 ml asam klorida pekat. Maka akan memberi warna merah.

Cawan 2 : filtrat 1 ml diuapkan sampai kering lalu dilarutkan dalam 2 ml etanol lalu tambah 0,5 g serbuk magnesium dan 1 ml asam klorida pekat. Maka akan memberi warna merah, kuning, ungu atau jingga (Herman et al., 2020).

2.14.3. Uji Saponin

Panaskan akuades sampai mendidih. Sebanyak 1 gram ekstrak metanol dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu tambahkan 10 ml akuades panas. Dinginkan dan kemudian kocok kuat selama 10 detik. Apabila terbentuk buih yang stabil selama 10 menit setinggi 1 cm sampai 10 cm dan tidak hilang dengan penambahan 3 tetes asam klorida 2 N maka menunjukkan adanya saponin (Herman et al., 2020).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Theobroma cacao L. Famili *Malvaceae* merupakan jenis tumbuhan yang teridentifikasi di Bidang Botani "Herbarium Bogoriense" Pusat Penelitian Biologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI)-Bogor. Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI)-Bogor Kulit buah kakao diberi nama sesuai dengan tumbuhan yang teridentifikasi, yaitu batang, bunga, buah, dan daun. Selanjutnya, tumbuhan tersebut dibandingkan dengan koleksi herbarium yang ada di "Herbarium Bogoriense". Identifikasi tumbuhan tersebut bertujuan untuk membuktikan bahwa tumbuhan yang digunakan adalah tumbuhan Kakao (*Theobroma cacao* L.).

3.1. Hasil Perolehan Simplisia dan Serbuk Simplisia

Untuk penelitian ini diperoleh kulit buah kakao segar sebanyak 26,5 kg dengan menggunakan 40,25 kg buah kakao segar. Sampel buah kakao diambil terlebih dahulu, kemudian dilakukan sortasi basah untuk memisahkan kotoran yang menempel pada buah dari sisa-sisa komponen tanaman atau benda asing lainnya. Kulit buah kakao dikeringkan dan membuang kotoran yang menempel pada kulit buah. Kulit buah kakao segar kemudian ditimbang, diiris tipis dan dianginkan selama 24 jam untuk memastikan getah pada kulit tidak lengket lagi. Kemudian dimasukkan ke dalam lemari pengering dengan suhu 40 hingga 50 derajat Celsius hingga kering. Prosedur pengeringan ini bertujuan untuk menurunkan kadar udara dalam kulit buah kakao agar tidak terbentuk mikroba yang dapat merusak simplisia, terlihat dari kulit buah yang mudah pecah. Untuk membedakan buah kakao yang terbakar dan yang rusak akibat terbentuknya jamur selama proses pengeringan, buah kakao yang sudah kering disortir hingga kering. Setelah biji kakao digiling dengan blender dan diayak simplisia bubuk yang dihasilkan ditimbang untuk mengetahui berat totalnya yang hasilnya adalah 3,9 kg. Setelah itu, simplisia bubuk disimpan dalam wadah tertutup rapat dan dapat melindungi simplisia dari kontaminasi mikroba dan masuknya zat asing yang dapat menurunkan kualitasnya. Simplisia disimpan pada suhu ruangan, yaitu antara 20 dan 25 °C.

3.2. Hasil Perolehan Ekstrak Metanol Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Tahap pertama dalam memperoleh zat kimia yang aktif secara farmakologis dari tanaman adalah ekstraksi. Efektivitas, efisiensi, dan aktivitas biologis komponen kimia tanaman sangat dipengaruhi oleh proses ekstraksi dan polaritas pelarut. Polaritas pelarut akan menentukan prinsip kelarutan utama komponen kimia yang diperoleh dari tanaman. Setelah 300 g bubuk kulit buah kakao diekstraksi dengan perkolasi dengan pelarut metanol, diikuti dengan proses maserasi selama 24 jam, dihasilkan 14,41 g ekstrak metanol kental. Pada tanaman, pelarut metanol memiliki kemampuan untuk menarik zat polar, semi-polar, dan non-polar. Manfaat dari penggunaan metode perkolasi adalah tidak adanya saturasi dan tidak perlunya prosedur lebih lanjut karena sampel telah dipisahkan dari ekstrak; Namun, kelemahan dari pendekatan perkolasi adalah memerlukan sejumlah besar pelarut dan pelarut menjadi dingin selama proses berlangsung, sehingga tidak efektif dalam melarutkan komponen. Aktivitas antibakteri dari ekstrak metanol yang dihasilkan diperiksa.

3.3. Hasil Penentuan Diameter Zona Hambat *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis* dan *Staphylococcus epidermidis*

Metode difusi sumur digunakan dalam penelitian ini untuk menentukan aktivitas antibakteri, inokulum jamur dan bakteri dimasukkan ke permukaan atas media agar padat untuk menginokulasinya sumur berdiameter 6 mm kemudian dibuat

secara aseptik dan larutan ekstrak atau agen antimikroba diberikan ke dalam sumur pada konsentrasi yang sesuai kemudian diinkubasi sesuai dengan kebutuhan mikroorganisme uji bahan antimikroba akan menyebar ke seluruh media agar dan mencegah bakteri yang diuji tumbuh (Anatasya Pajan et al., 2016). Perkembangan zona penghambatan di sekitar sumur menunjukkan adanya aksi antimikroba. Kaliper manual digunakan untuk mengukur zona penghambatan yang dihasilkan dari hasil uji dengan presisi 0,5 mm. Tabel 1. menampilkan temuan uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol kulit buah kakao.

Tabel 1. Hasil Pengukuran Diameter Hambat Pada Pengujian Aktivitas Antimikroba Ekstrak Metanol Kulit Buah Kakao.

Konsentrasi	Diameter daerah hambat pertumbuhan antimikroba (mm)			
Ekstrak metanol (mg/ml)	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
100	21,68	14,06	14,4	15
50	19,05	12,71	13,4	12,5
25	13,06	12,1	12,08	10,04
12,5	10,75	11,48	11,4	10
6,25	9,76	9,81	10,43	8,51
3,125	0	0	0	0
Blanko Positif	16,13	25,26	26,46	20,26
Blanko Negatif	0	0	0	0

Keterangan: dari tabel diatas menunjukan Hasil rata-rata dilakukan tiga kali pengulangan mulai dari pengukuran bakteri *Streptococcus pyogenes* dengan obat Nystatin 0,1 mg/ml, blanko positif untuk *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis* dan *Staphylococcus epidermidis* = kloramfenikol 0,5 mg/ml, blanko negatif = campuran dimetil sulfoksida dan etanol (5:4), mm = millimeter, hasil diameter zona hambat belum dikurangi pencadang logam (d=6mm).

Ukuran zona hambat yang terbentuk menentukan jenis aksi antibakteri Menurut (Trisina et al., 2024) antibiotik dengan nilai zona hambat 6–10 mm memiliki aktivitas antimikroba yang lemah, yang memiliki nilai 11–20 mm tergolong aktif, dan yang memiliki nilai 21–30 mm atau lebih dianggap sangat aktif. Diameter zona hambat cenderung tumbuh seiring bertambahnya larutan uji. Telah dibuktikan bahwa ekstrak metanol konsentrasi kulit buah kakao menunjukkan aksi antibakteri terhadap *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes* dan *Staphylococcus epidermidis*. Hasilnya ditunjukkan pada Tabel 3.1. Karena daya hambat antimikroba kulit buah kakao jelaslah bahwa diameter hambat di sekitar agar cukup baik pada konsentrasi 100 mg/ml ia menunjukkan diameter hambat sebesar 21,68 mm pada bakteri *Streptococcus pyogenes*, 14,06 mm pada bakteri *Bacillus subtilis*, 14,4 mm pada bakteri *Proteus mirabilis* dan 15 mm pada bakteri *Staphylococcus epidermidis* aa memiliki diameter hambat terkuat jika dibandingkan dengan persyaratan uji aktivitas diameter 10–20 mm dianggap kuat, diameter 9–5 mm dianggap sedang dan diameter kurang dari 5 mm dianggap lemah jumlah aktivitas mikroba memiliki dampak signifikan pada diameter hambat zat uji yang ditempatkan ke dalam sumur agar.

Jumlah zat aktif, seperti flavonoid, glikosida antrakuinon, tanin dan triterpenoid yang ada di permukaan buah kakao memengaruhi reaksi diameter penghambatan pertumbuhan mikroba. Beberapa kelas bahan kimia metabolit sekunder telah menunjukkan karakteristik antibakteri dan mode aksi berikutnya dalam penelitian sebelumnya flavonoid, glikosida antrakuinon, tanin dan triterpenoid adalah contoh bahan kimia polifenol yang berfungsi sebagai mekanisme pertahanan tanaman terhadap mikroba berbahaya. Mekanisme antibakteri flavonoid menunjukkan kerusakan pada permeabilitas lisosom, mikrosom dan dinding sel. Menurut (Zahki, 2023), aksi antibakteri tanin mencegah pembentukan sel dengan menghambat enzim reverse transcriptase dan DNA topoisomerase. Triterpenoid bekerja sebagai antimikroba dengan bereaksi dengan porin yang merupakan protein transmembran yang ditemukan pada dinding sel membran luar bakteri dan menciptakan hubungan polimer yang kuat, yang merusak porin. Bahan kimia penghambat akan mengurangi permeabilitas dinding sel dengan merusak porin melalui masukan dan pengeluaran nutrisi (Sheren J. Bermula, 2022).

Flavonoid merupakan senyawa fenol yang dapat membentuk ikatan kompleks dengan protein sehingga dapat merusak membran sel yang menyebabkan keluarnya senyawa intraseluler (Rachmawaty dkk., 2017). Mekanisme kerja flavonoid sebagai antijamur yaitu dengan menyebabkan gangguan permeabilitas membran sel jamur (Adellina, 2017). Selain itu flavonoid juga dapat menghambat metabolisme energi bakteri (Hudri, 2014). Mekanisme kerja saponin sebagai antijamur yaitu dengan menurunkan tegangan permukaan membran sterol dari sel jamur sehingga permeabilitasnya meningkat. Permeabilitas yang meningkat dapat mengakibatkan keluarnya cairan intraseluler dan mengakibatkan kematian pada sel jamur (Adellina, 2017). Sedangkan mekanisme kerja sebagai antibakteri yaitu dengan mendenaturasi protein. Karena zat aktif permukaan saponin mirip deterjen maka saponin dapat bertindak sebagai antibakteri dengan menurunkan tegangan permukaan sehingga mengakibatkan naiknya permeabilitas atau kebocoran sel dan mengakibatkan senyawa intraseluler akan keluar (Sudarmi dkk., 2017; Situmorang, 2016). Triterpenoid memiliki aktivitas sebagai

antijamur dengan mekanisme kerja mengganggu permeabilitas sel jamur sehingga jamur tidak dapat bertahan hidup (Adellina, 2017). Tanin merupakan senyawa polifenol yang mengikat protein pada dinding sel bakteri sehingga dapat menghambat pembentukan dinding sel dan mengganggu permeabilitas membran sel (Chusniasih dkk., 2020).

3.5 Hasil Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia yang dilakukan terhadap ekstrak metanol kulit buah Kakao bertujuan untuk mendapatkan informasi golongan senyawa metabolit sekunder yang terdapat didalamnya. Adapun pemeriksaan yang dilakukan meliputi pemeriksaan golongan alkaloid, antrakuinon glikosida, flavonoid, glikosida, sianogenik glikosida, saponin, steroid/triterpenoid dan tanin. Hasil skrining fitokimia ekstrak metanol kulit buah Kakao. Berdasarkan hasil skrining fitokimia pada Tabel diatas dapat disimpulkan bahwa ekstrak metanol kulit buah Kakao memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder seperti antrakuinon glikosida, flavonoid, saponin, tanin dan triterpenoid. Serta tidak ditemukan adanya senyawa alkaloid, glikosida dan sianogenik glikosida dalam ekstrak metanol kulit buah Kakao. Pengujian alkaloid dengan pereaksi Mayer, Dragendorf dan Bouchardat memberikan hasil negatif karena tidak terbentuknya endapan putih pada penambahan pereaksi Mayer serta endapan coklat pada penambahan pereaksi Dragendorf dan Bouchardat. Endapan tersebut terbentuk karena senyawa alkaloid berikatan koordinasi dengan ion K⁺ dari pereaksi-pereaksi tersebut. Adapun perbedaan warna endapan pada penambahan setiap pereaksi dikarenakan kandungan logam golongan transisi dalam pereaksi Mayer, Dragendorf dan Bouchardat yang berbeda-beda (Prabasari dkk., 2019).

Pengujian antrakuinon glikosida dengan pereaksi NaOH menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan terbentuknya warna merah pada lapisan air. Hal ini dikarenakan penambahan FeCl₃ dapat memecah gula dari aglikonnya. Pengujian flavonoid menunjukkan hasil positif, penambahan serbuk magnesium dan zinkum dengan asam klorida bertujuan untuk mereduksi senyawa flavonoid yang ada sehingga menimbulkan reaksi warna merah yang merupakan ciri adanya senyawa flavonoid (Mierza, 2020; Laia, 2019). Pengujian glikosida dengan menggunakan pereaksi molish. Dilakukan hidrolisis dengan pemanasan dalam larutan asam untuk mengidentifikasi adanya gula pada glikosida. Adapun hasil skrining fitokimia ekstrak metanol kulit buah Kakao menunjukkan hasil negatif pengujian saponin menunjukkan hasil positif yang ditandai terbentuknya buih. Terbentuknya buih dikarenakan adanya kombinasi struktur senyawa penyusun antara gugus polar yaitu glikosil dan gugus nonpolar yaitu steroid/triterpenoid. Kombinasi ini bersifat aktif permukaan dan membentuk misel saat dikocok dengan air. Pada struktur misel gugus polar menghadap ke luar sedangkan struktur misel gugus nonpolar menghadap ke dalam dan keadaan inilah yang tampak seperti buih/busa. Pengujian sianogenik glikosida menunjukkan hasil negatif. Secara prinsip pengujian sianogenik glikosida menggunakan kertas pikrat atas dasar hidrolisis linamarin yang merupakan senyawa terbesar dari golongan glikosida sianogenik yang melepaskan HCN yang kemudian dideteksi dengan kertas pikrat. Hasil positif sianogenik glikosida ditandai dengan perubahan warna pada kertas pikrat menjadi merah. Perubahan warna terjadi akibat HCN yang dilepaskan dalam reaksi hidrolisis akan bereaksi dengan asam pikrat yang terdapat dalam kertas saring yang sebelumnya telah ditetesi natrium pikrat.

Pengujian steroid/triterpenoid menggunakan pereaksi Liebermann-Bouchard, terbentuk perubahan warna yang disebabkan oleh gugus yang dimiliki keduanya berbeda pada atom C-4 yang menyebabkan senyawa ini cenderung bersifat semipolar. Hasil positif steroid ditandai dengan perubahan warna menjadi hijau-biru. Sedangkan hasil positif triterpenoid ditandai dengan perubahan warna menjadi merah-ungu. Pengujian tanin menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan perubahan warna menjadi hijau kehitaman akibat pembentukan senyawa kompleks antara tanin dengan FeCl₃. Tanin merupakan golongan polihidroksi fenol (polifenol) yang dapat dibedakan dari fenol lain karena kemampuannya mengendapkan protein.

4. KESIMPULAN

Ekstrak metanol kulit buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) memiliki aktivitas antimikroba terhadap *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus epidermidis* pada pengujian antibakteri ini mempunyai aktivitas terbesar pada bakteri *Streptococcus pyogenes* sebesar 21,68 pada konsentrasi 100 mg/ml dan paling rendah pada bakteri *Staphylococcus epidermidis* sebesar 8, 51 pada konsentrasi 3,125 mg/ml kemudian pada ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) mempunyai kandungan senyawa kimia seperti, antarkuinon glikosida, glikosida, flavonoid, saponin, tannin dan triterpenoid lalu dalam kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) itu dapat disimpulkan dapat digunakan sebagai pengobatan antibakteri secara alami.

REFERENCES

- Adha, S. D., & Ibrahim, M. (2021). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes*. *LenteraBio : Berkala Ilmiah Biologi*, 10(2), 140–145. <https://doi.org/10.26740/lenterabio.v10n2.p140-145>
- Adriana, L., Dewi, C., & Nasir, N. H. (2023). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Keji Beling (*Strobilanthes crispus* BI) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal Pharmacia Mandala Waluya*, 2(3), 162–174. <https://doi.org/10.54883/jpmw.v2i3.82>
- Anatasya Pajan, S., Waworuntu, O., & Leman, M. A. (2016). POTENSI ANTIBAKTERI AIR PERASAN BAWANG PUTIH (*Allium sativum* L.) TERHADAP PERTUMBUHAN *Staphylococcus aureus*. *PHARMACONJurnal Ilmiah Farmasi-UNSRAT*, 5(4), 77–89.

- Ariyana, M. D., Widyastuti, S., Nazaruddin, N., Handayani, B. R., & Amaro, M. (2021). APLIKASI ANTIMIKROBA ALAMI EKSTRAK *Sargassum crassifolium* SEBAGAI AGEN DESINFEKSI UNTUK MENINGKATKAN MUTU MIKROBIOLOGIS TELUR AYAM KAMPUNG. *Prosiding SAINTEK*, 3, 602–611.
- BR PA, A. M. S., Masfria, & Sitorus, P. (2022). Phytochemical Screening and Antibacterial Activity Ethanolic Extract of *Solanum mauritianum* Scop Leaves Against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Science, Technology & Management*, 3(6), 1556–1562. <https://doi.org/10.46729/ijstm.v3i6.648>
- Febriani, Y., Ansyah, A., Razali, M., & Margata, L. (2024). Uji Aktivitas ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAUN KIRINYUH (*Chromolaena odorata*) TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Escherichia coli* DAN *Staphylococcus aureus*. *Forte Journal*, 4(1), 225–231. <https://doi.org/10.51771/fj.v4i1.791>
- Herman, Septriyanti, I., Ramadhani, T. R., Ade, P., Yulis, R., & Putra, A. Y. (2020). Ekstrak Etanol Limbah Kulit Buah Kakao (*Theobroma Cacao* L.). *JEDCHEM (Journal Education and Chemistry)*, 2(2), 57–61.
- Husniah, I., & Gunata, A. F. (2020). Ekstrak Kulit Nanas sebagai Antibakteri. *Jurnal Penelitian Perawat Profesional*, 2(1), 85–90. <https://doi.org/10.37287/jppp.v2i1.51>
- Indarto, I., Narulita, W., Anggoro, B. S., & Novitasari, A. (2019). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Binahong Terhadap *Propionibacterium Acnes*. *Biosfer: Jurnal Tadris Biologi*, 10(1), 67–78. <https://doi.org/10.24042/biosfer.v10i1.4102>
- Matandung, L. F., Rares, F. E. S., & Waworuntu, O. A. (2024). Identifikasi Pola Bakteri dan Uji Sensitivitas Antibiotik di Poli Infeksi dan Imunologi Rumah Sakit Mata Provinsi Sulawesi Utara. *E-CliniC*, 12(3), 277–282. <https://doi.org/10.35790/ec.v12i3.53539>
- Mierza, V., Nasution, M. P., & Suryanto, D. (2021). ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF RESIDUE FRACTION FROM ETHANOL EXTRACT OF BAWANG SABRANG (*Eleutherine palmifolia* Merr.) BULBS AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI SISA DARI EKSTRAK ETANOL UMBI BAWANG SABRANG (*Eleutherine palmifolia* Merr.). 4(2), 60–68.
- Mopangga, E., Yamlean, P. V. Y., & Abdullah, S. S. (2021). Formulasi Sediaan Sabun Mandi Padat Ekstrak Etanol Daun Gedi (*Abelmoschus manihot* L.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus epidermidis*. *Jurnal Pharmacon*, 10(3), 1017–1024.
- Mustofa, S., & Adilla, P. (2024). Metode Molekuler untuk Mendeteksi Mikroba Penyebab Penyakit Patogen. *Medula*, 14(2), 351–354.
- Nisak, K., & Rini, C. S. (2021). Effectiveness of The Antibacterial Activity on *Orthosiphon aristatus* Leaves Extract Against *Proteus mirabilis* and *Staphylococcus saprophyticus*. *Medicra (Journal of Medical Laboratory Science/Technology)*, 4(2), 72–77. <https://doi.org/10.21070/medicra.v4i2.1582>
- Prasetyo, B. F. (2021). Uji Aktivitas Antioksidan dan Daya Hambat Enzim Tirosinase Ekstrak Etanol *Azolla filiculoides* Lam. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 8(1), 53. <https://doi.org/10.25077/jsfk.8.1.53-59.2021>
- Ridwan, Y., Satrija, F., & Handharyani, E. (2020). In Vitro Anticestode Activity of Secondary Metabolite of *Coleus blumei*. Benth Leaves on *Hymenolepis microstoma*. *Jurnal Medik Veteriner*, 3(1), 31–37. <https://doi.org/10.20473/jmv.vol3.iss1.2020.31-37>
- Rina Amelia, Slamet Triyadi, U. M. (2023). 3 1,2,3. *Jurnal Ilmiah Wahana Pendidikan*, 9(23), 656–664.
- Saputri, M., & Mierza, V. (2020). Aktivitas Antibakteri Sediaan Gel dari Fraksi Aktif Daun Sintrong (*Crassocephalum Crepidioides* (Benth) S Moore). *Journal of Pharmaceutical and Health Research*, 1(3), 72–76. <https://doi.org/10.47065/jharma.v1i3.595>
- Sheren J. Bermula, W. M. J. L. T. F. A. K. (2022). Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Etanol Daun Leilem *Clerodendrum minahassae* L. Terhadap *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Candida albicans*. *Majalah InfoSains*, 3(2), 51–58.
- Sudewi. (2023). Formulation of Lotion Ethanol Extract of Kecombrang Leaves Kecombrang Leaves (*Etlingera elatior* (Jack) R.M. Sm.) as Antibacterial. *Jambura Journal of Health Science and Research*, 1080–1087. <https://ejurnal.ung.ac.id/index.php/jjhsr/index>
- Trisina, J., Yeziel, Y., Sekeon, T., & Febiani, F. (2024). Uji EFEK ANTIBAKTERI KOMBINASI DAUN GEDI DAN DAUN KUMIS KUCING TERHADAP *Staphylococcus aureus* THE ANTIBACTERIAL ASSAY OF THE COMBINATION OF GEDI AND JAVA TEA LEAVES AGAINST *Staphylococcus aureus*. 6(3).
- Zahki, M. (2023). Efektifitas Antibakteri Senyawa Metabolit Sekunder Pada Beberapa Tanaman Obat Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus Aureus*. *Usadha*, 2(2), 25–30. <https://doi.org/10.36733/usadha.v2i2.5927>
- Zebua, N. F., Mierza, V., Wardani, L., Mulya, R., & Safita, D. (2023). *Journal of Pharmaceutical and Health Research Formulasi Sediaan Ekstrak Etanol Daging Buah Pare (Momordica charantia L.) Sebagai Krim Alas Bedak Journal of Pharmaceutical and Health Research*. 4(2), 333–341. <https://doi.org/10.47065/jharma.v4i2.3700>