

UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETIL ASETAT DAUN KAKAO (*THEOBROMA CACAO L.*) DALAM MENGHAMBAT PERTUMBUHAN BAKTERI *ESCHERICHIA COLI*

Rahmatul Izzah^{1*}, Sri Winarni Sofya², Mia Ariasti³

^{1,2,3}Program Studi S1 Farmasi, Universitas Bumigora

*Email korespondensi: rahmaizza65@gmail.com

Received: 2 April 2026; Revised: 10 April 2026; Accepted: 21 April 2026

Abstract

Infectious diseases caused by pathogenic bacteria remain a global health problem, especially in developing countries. Escherichia coli is a Gram-negative bacterium that is a major cause of gastrointestinal and wound infections, with a high incidence rate and exacerbated by increasing antibiotic resistance. This situation encourages the search for alternative antibacterial sources based on natural ingredients. Cocoa leaves (Theobroma cacao L.) are known to contain various secondary metabolites such as flavonoids, alkaloids, tannins, saponins, terpenoids, and steroids that have antibacterial potential. This study aims to explore the antibacterial activity of ethyl acetate extract of cocoa leaves against E. coli and evaluate the effect of varying extract concentrations on bacterial growth inhibition. Extraction was carried out using the maceration method with ethyl acetate as a solvent, then tested for antibacterial activity using the diffusion method. The results showed that different extract concentrations produced varying antibacterial responses, although the changes were not yet significant. At a concentration of 60%, the extract began to show antibacterial activity as indicated by the formation of an inhibition zone, albeit with a relatively small diameter. Other concentrations showed inhibition zone diameters that tended to be similar and did not show a significant increase. These findings indicate that the concentration range used does not fully reflect the differences in optimal antibacterial response. This study concludes that ethyl acetate extract of cocoa leaves has antibacterial potential against E. coli. However, further research with a wider range of concentrations and additional testing methods is needed to determine the optimal concentration and mechanism of action.

Keywords: cocoa leaves (*theobroma cacao l.*), ethyl acetate extract, antibacterial, *escherichia coli*, amoxicillin.

Abstrak

Penyakit infeksi akibat bakteri patogen masih menjadi masalah kesehatan global, terutama di negara berkembang. *Escherichia coli* merupakan salah satu bakteri Gram-negatif penyebab utama infeksi saluran cerna dan luka, dengan angka kejadian yang tinggi serta diperparah oleh meningkatnya resistensi antibiotik. Kondisi ini mendorong pencarian sumber antibakteri alternatif berbasis bahan alam. Daun kakao (*Theobroma cacao L.*) diketahui mengandung berbagai metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, terpenoid, dan steroid yang berpotensi sebagai antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat daun kakao terhadap *E. coli* serta mengevaluasi pengaruh variasi konsentrasi ekstrak terhadap daya hambat pertumbuhan bakteri. Ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etil asetat, kemudian diuji aktivitas antibakterinya menggunakan metode difusi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perbedaan konsentrasi ekstrak

memberikan respons antibakteri yang bervariasi, meskipun perubahannya belum signifikan. Pada konsentrasi 60%, ekstrak mulai menunjukkan aktivitas antibakteri yang ditandai dengan terbentuknya zona hambat, meskipun dengan diameter yang relatif kecil. Konsentrasi lainnya menunjukkan diameter zona hambat yang cenderung serupa dan belum memperlihatkan peningkatan yang berarti. Temuan ini mengindikasikan bahwa rentang konsentrasi yang digunakan belum sepenuhnya menggambarkan perbedaan respons antibakteri yang optimal. Penelitian ini menyimpulkan bahwa ekstrak etil asetat daun kakao memiliki potensi sebagai antibakteri terhadap *E. coli*, namun diperlukan penelitian lanjutan dengan variasi konsentrasi yang lebih luas serta metode pengujian tambahan untuk menentukan konsentrasi optimal dan mekanisme kerjanya.

Kata kunci: daun kakao (*Theobroma cacao* L.), ekstrak etil asetat, antibakteri, *Escherichia coli*, amoksisilin.

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi bakteri masih menjadi masalah penting dalam kesehatan masyarakat. Tantangan tersebut semakin kompleks karena meningkatnya resistensi antimikroba yang menyebabkan penurunan efektivitas beberapa antibiotik dalam mengatasi infeksi bakteri. World Health Organization melaporkan bahwa resistensi antimikroba merupakan ancaman global yang berdampak pada efektivitas terapi infeksi, termasuk pada bakteri patogen yang umum ditemukan dalam pelayanan kesehatan dan lingkungan masyarakat (World Health Organization [WHO], 2023). Dalam laporan WHO, resistensi terhadap antibiotik generasi ketiga pada *E. coli* juga dilaporkan menjadi perhatian penting dalam surveilans global resistensi antimikroba.

Salah satu bakteri patogen yang sering dikaitkan dengan infeksi pada manusia adalah *Escherichia coli*. Bakteri ini merupakan bakteri Gram-negatif yang secara normal dapat ditemukan pada saluran pencernaan manusia dan hewan. Sebagian besar strain *E. coli* bersifat tidak berbahaya, tetapi strain patogen dapat menyebabkan berbagai penyakit, terutama infeksi saluran cerna dan diare (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2024). CDC juga

menjelaskan bahwa *E. coli* patogen dikelompokkan ke dalam beberapa patotipe berdasarkan faktor virulensinya, termasuk enteropathogenic *E. coli*, enterotoxigenic *E. coli*, enteroinvasive *E. coli*, Shiga toxin-producing *E. coli*, dan enteroaggregative *E. coli* (CDC, 2024).

Struktur dinding sel *E. coli* sebagai bakteri Gram-negatif menjadi salah satu faktor yang dapat memengaruhi sensitivitasnya terhadap senyawa antibakteri. Bakteri Gram-negatif memiliki membran luar yang berperan sebagai penghalang fisik dan kimia terhadap masuknya berbagai senyawa antimikroba. Delcour (2009) menjelaskan bahwa komposisi lipid dan protein pada membran luar bakteri Gram-negatif memengaruhi sensitivitas bakteri terhadap antibiotik dan senyawa antibakteri. Oleh karena itu, senyawa antibakteri dari ekstrak tanaman sering kali menunjukkan aktivitas yang lebih lemah terhadap bakteri Gram-negatif dibandingkan terhadap bakteri Gram-positif.

Pemanfaatan tanaman obat sebagai sumber senyawa antibakteri alami menjadi salah satu alternatif yang banyak dikembangkan. Senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, tanin, alkaloid, fenolik, dan terpenoid diketahui memiliki potensi sebagai antibakteri melalui berbagai mekanisme,

antara lain mengganggu permeabilitas membran sel, menghambat enzim, merusak protein sel, mengganggu sintesis asam nukleat, serta memengaruhi pembentukan biofilm (Jubair et al., 2021; Shamsudin et al., 2022). Flavonoid, misalnya, dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri dengan mekanisme yang beragam, termasuk kerusakan membran, penghambatan sintesis asam nukleat, serta gangguan metabolisme energi bakteri.

Daun kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan bagian tanaman yang berpotensi dikembangkan sebagai sumber bahan alam karena mengandung metabolit sekunder. Maqfirah et al. (2023) melaporkan bahwa ekstrak etanol daun kakao mengandung alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid, dan glikosida, sedangkan fraksi etil asetat daun kakao mengandung alkaloid, flavonoid, tanin, steroid, dan glikosida. Temuan tersebut mendukung dasar ilmiah penggunaan pelarut etil asetat dalam menarik senyawa bioaktif semipolar dari daun kakao.

Beberapa penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa daun kakao memiliki potensi antibakteri. Hayati et al. (2022) melaporkan bahwa ekstrak etanol daun *Theobroma cacao* L. terhadap *E. coli* menghasilkan zona hambat pada kisaran 5–10 mm dan dinyatakan kurang efektif, meskipun terdapat korelasi positif antara peningkatan konsentrasi ekstrak dan diameter zona hambat yang terbentuk. Mandhaki et al. (2021) juga melaporkan aktivitas antibakteri fraksi daun kakao terhadap *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. Dengan demikian, kajian terhadap ekstrak etil asetat daun kakao terhadap *E. coli* masih relevan dilakukan untuk memperkaya bukti mengenai potensi antibakteri daun kakao.

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini bertujuan untuk menguji

aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat daun kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* serta mengevaluasi pengaruh variasi konsentrasi ekstrak terhadap diameter zona hambat yang terbentuk.

METODE

Penelitian ini merupakan studi eksperimental laboratorium yang bertujuan untuk menguji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat daun kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kakao yang diperoleh dari Dusun Kayu Putih, Desa Tempos, Kecamatan Gerung, Kabupaten Lombok Barat, Nusa Tenggara Barat.

Daun kakao yang digunakan adalah daun segar, utuh, bebas dari kerusakan fisik, hama, atau kontaminasi. Prioritas diberikan pada daun tua karena kandungan metabolit sekundernya relatif lebih tinggi. Sebelum digunakan, daun kakao diidentifikasi di Laboratorium Terpadu UIN Mataram untuk memastikan identitas botani tanaman dan menghindari kesalahan penggunaan bahan.

Mikroorganisme uji yang digunakan adalah bakteri *Escherichia coli*. Variabel independen dalam penelitian ini adalah ekstrak etil asetat daun kakao dengan konsentrasi 20%, 40%, dan 60%. Variabel dependen adalah aktivitas antibakteri yang ditunjukkan melalui diameter zona hambat pertumbuhan *E. coli*. Variabel kontrol meliputi penggunaan bakteri uji yang sama, metode pengujian yang seragam, dan kondisi inkubasi yang sama.

Persiapan sampel dilakukan melalui beberapa tahap. Daun kakao dikumpulkan pada pagi hari untuk menjaga kestabilan kandungan metabolit sekundernya. Daun yang telah dikumpulkan kemudian disortasi basah untuk memisahkan bagian yang tidak sesuai, lalu dicuci menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran dan kontaminan. Setelah itu, daun dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C selama kurang lebih 50 menit hingga kering. Daun yang telah kering disortasi kembali untuk memastikan tidak terdapat benda asing atau bagian yang tidak layak digunakan. Selanjutnya, daun dicincang dan digiling hingga diperoleh serbuk simplisia.

Ekstraksi daun kakao dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etil asetat. Sebanyak 300 gram serbuk daun kakao dimasukkan ke dalam wadah maserasi, kemudian ditambahkan pelarut etil asetat dengan rasio 1:10 (b/v). Proses maserasi dilakukan selama tiga hari dengan pengadukan secara berkala. Filtrat hasil maserasi disaring dan diuapkan menggunakan rotary vacuum evaporator hingga diperoleh ekstrak etil asetat daun kakao yang kental.

Ekstrak yang diperoleh kemudian diuji kandungan fitokimianya untuk mengidentifikasi keberadaan metabolit sekunder. Skrining fitokimia meliputi pengujian alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin. Uji alkaloid dilakukan menggunakan reagen Mayer, Wagner, dan Dragendorff. Uji flavonoid dilakukan dengan penambahan serbuk magnesium dan HCl pekat. Uji saponin dilakukan dengan pengocokan hingga terbentuk busa stabil,

sedangkan uji tanin dilakukan menggunakan reagen FeCl_3 .

Seluruh alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian disterilkan untuk mencegah kontaminasi. Alat gelas dan logam disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit. Larutan tertentu disterilkan menggunakan metode filtrasi membran. Media Mueller-Hinton Agar (MHA) disiapkan dengan melarutkan 10 gram serbuk MHA dalam 500 mL air steril, dipanaskan hingga homogen, kemudian dituangkan ke dalam cawan petri steril dan dibiarkan hingga mengeras.

Suspensi bakteri *E. coli* disiapkan dengan melarutkan koloni bakteri ke dalam larutan NaCl fisiologis 0,9%. Keekeruhan suspensi disesuaikan dengan standar 0,5 McFarland menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm untuk memperoleh konsentrasi bakteri yang seragam. Suspensi bakteri kemudian diinokulasikan secara merata pada permukaan media MHA menggunakan metode *spread plate*.

Uji aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi. Lubang dibuat pada media MHA yang telah diinokulasi menggunakan alat pelubang gabus nomor 4. Setiap lubang diisi dengan ekstrak etil asetat daun kakao pada konsentrasi 20%, 40%, dan 60%. Amoksisilin digunakan sebagai kontrol positif. Setelah perlakuan diberikan, media diinkubasi, kemudian diameter zona hambat yang terbentuk diukur dalam satuan milimeter.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Proses Pembuatan Ekstrak Etil Asetat Daun Kakao

Daun kakao (*Theobroma cacao* L.) yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Dusun Kayu Putih, Desa Tempos, Kecamatan Gerung, Kabupaten Lombok Barat. Identifikasi tanaman dilakukan untuk memastikan kebenaran spesies tanaman yang digunakan. Tahap identifikasi penting dalam penelitian bahan alam karena kesalahan identifikasi dapat memengaruhi validitas hasil penelitian.

Daun kakao yang telah dikumpulkan kemudian melalui proses sortasi, pencucian, pengeringan, penggilingan, dan penyaringan hingga diperoleh serbuk simplisia. Proses pengeringan bertujuan untuk menurunkan kadar air bahan, menghambat pertumbuhan mikroorganisme, dan menjaga kestabilan senyawa aktif. Ukuran partikel simplisia yang lebih seragam dapat meningkatkan luas permukaan kontak antara bahan dan pelarut, sehingga proses ekstraksi menjadi lebih optimal.

Tabel 1 Data Proses Pembuatan Ekstrak Etil Asetat Daun Kakao

Komponen	Massa
Berat basah daun kakao	5kg

Berat serbuk daun kakao	200mg
Berat ekstrak daun kakao	23,6

Ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etil asetat. Dari 200 g serbuk simplisia diperoleh ekstrak kental sebanyak 23,6 g, sehingga rendemen ekstrak sebesar 11,8%. Rendemen ekstrak dipengaruhi oleh jenis pelarut, rasio bahan dan pelarut, lama ekstraksi, suhu, ukuran partikel, dan karakteristik senyawa yang terdapat dalam simplisia. Etil asetat merupakan pelarut semipolar yang dapat menarik senyawa aktif tertentu, termasuk sebagian senyawa fenolik dan flavonoid. Hal ini selaras dengan temuan Maqfirah et al. (2023) yang melaporkan bahwa fraksi etil asetat daun kakao mengandung alkaloid, flavonoid, tanin, steroid, dan glikosida.

Tabel 2. Hasil Skrining Fitokimia

Golongan senyawa	Reagen	Warna standar	Perubahan warna	Hasil
Alkaloid	Mayer	jingga	jingga	+
	Dragendorff	Jingga/kuning	jingga	+

Flavonoid	Mg + HCl pekat	Merah/jingga	merah	+
Fenol/tanin	FeCl ₃	Hijau kehitaman	hijau	+
saponin	HCl 2N	Berbusa	Tidak ada busa	-

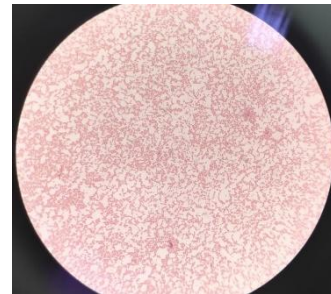
*Keterangan : (+) ada senyawa dan (-) tidak ada senyawa.

Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat daun kakao mengandung alkaloid, flavonoid, serta fenol/tanin, sedangkan saponin tidak terdeteksi. Hasil ini sesuai dengan karakteristik pelarut etil asetat sebagai pelarut semipolar yang lebih selektif dalam menarik senyawa tertentu. Maqfirah et al. (2023) juga melaporkan bahwa fraksi etil asetat daun kakao mengandung alkaloid, flavonoid, tanin, steroid, dan glikosida.

Keberadaan flavonoid, alkaloid, dan tanin mendukung potensi antibakteri ekstrak. Flavonoid dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri melalui mekanisme gangguan membran sel, penghambatan metabolisme energi, dan penghambatan sintesis asam nukleat. Alkaloid dapat mengganggu komponen sel bakteri dan proses metabolisme tertentu, sedangkan tanin dapat berikatan dengan protein sel

sehingga mengganggu fungsi dinding dan membran sel. Kajian mengenai senyawa antibakteri berbasis tanaman menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri ekstrak tanaman umumnya dipengaruhi oleh sinergi berbagai metabolit sekunder, bukan hanya satu senyawa tunggal (Jubair et al., 2021; Shamsudin et al., 2022).

Hasil Uji Pewarnaan Gram



Gambar. Pewarnaan gram

Pengamatan bakteri uji dilakukan untuk memastikan karakteristik bakteri sebelum uji aktivitas antibakteri. Secara umum, *Escherichia coli* merupakan bakteri Gram-negatif berbentuk batang atau basil yang hidup di saluran pencernaan manusia dan hewan. Sebagian strain bersifat komensal, sedangkan strain patogen dapat menyebabkan penyakit saluran cerna dan infeksi lain (CDC, 2024).

Dalam naskah awal disebutkan bahwa sel bakteri berbentuk coccus atau bulat. Bagian ini perlu dikoreksi secara ilmiah karena *E. coli* secara umum berbentuk basil atau batang, bukan coccus. Jika pengamatan mikroskopis

menunjukkan bentuk bulat, maka perlu dilakukan verifikasi ulang terhadap kemurnian isolat, kualitas pewarnaan Gram, atau kemungkinan kontaminasi. Koreksi ini tidak mengubah hasil penelitian, tetapi penting untuk menjaga akurasi mikrobiologi dalam naskah.

Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Daun Kakao

Tabel 3. Rincian Pengenceran Ekstrak Daun Kakao (*Theobroma cacao* L.)

kosent rasi	Ekstrak/ Stok	pengenc eran	volu me
20%	200µl	800µl	1ml
40%	400µl	600µl	1ml
60%	600µl	400µl	1ml

Uji aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi pada media Mueller-Hinton Agar. Metode difusi banyak digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antibakteri ekstrak tanaman karena sederhana, praktis, dan mampu memberikan gambaran awal mengenai kemampuan suatu bahan dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Namun, hasil metode ini sangat dipengaruhi oleh kemampuan senyawa aktif berdifusi ke dalam media agar, konsentrasi ekstrak, ukuran molekul senyawa, kelarutan, serta jenis mikroorganisme uji (Balouiri et al., 2016).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat daun kakao pada konsentrasi 20% dan 40% menghasilkan diameter 6 mm, sedangkan konsentrasi 60% menghasilkan diameter 8 mm. Diameter 6 mm dapat diinterpretasikan sebagai ukuran dasar lubang atau cakram, sehingga belum menunjukkan zona hambat aktif yang jelas di luar area perlakuan. Pada konsentrasi 60%, terbentuk zona hambat 8 mm yang menunjukkan adanya aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan *E. coli*, meskipun aktivitasnya masih tergolong lemah.

Kontrol positif amoksisilin menghasilkan zona hambat sebesar 27 mm. Hasil ini menunjukkan bahwa amoksisilin memiliki aktivitas antibakteri yang lebih kuat dibandingkan ekstrak etil asetat daun kakao. Perbedaan ini dapat dipahami karena amoksisilin merupakan antibiotik dengan mekanisme kerja spesifik, sedangkan ekstrak tanaman merupakan campuran kompleks berbagai metabolit sekunder dengan kadar senyawa aktif yang belum dimurnikan. Pada ekstrak kasar, konsentrasi senyawa aktif antibakteri dapat relatif rendah dan efeknya dapat dipengaruhi oleh senyawa lain yang tidak bersifat antibakteri.

Table 4. Analisis Diameter Zona Hambat Ekstrak Daun Kakao

Bakteri Uji <i>E. Coli</i>						
Konsentrasi	Pengulangan			Rata-rata (mm)	Kruskal Wallis Test	Mann-Whitney Test
	I	II	III			
20%	6	6	6	6	0.07	0.025
40%	6	6	6	6		
60%	8	8	8	8		
K (-)	2	27	27	27		
	7					

Berdasarkan Tabel 4, peningkatan konsentrasi dari 20% dan 40% ke 60% mulai menunjukkan peningkatan diameter zona hambat. Namun, peningkatan tersebut masih kecil, yaitu dari 6 mm menjadi 8 mm. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat daun kakao memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli*, tetapi belum optimal pada rentang konsentrasi yang diuji.

Hasil ini sejalan dengan penelitian Hayati et al. (2022), yang melaporkan bahwa ekstrak etanol daun *Theobroma cacao* L. terhadap *E. coli* menghasilkan zona hambat pada kisaran 5–10 mm dan

dinyatakan kurang efektif, meskipun peningkatan konsentrasi ekstrak berkorelasi positif dengan peningkatan zona hambat. Dengan demikian, hasil penelitian ini memperkuat dugaan bahwa daun kakao memang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli*, tetapi aktivitasnya dapat tergolong rendah, bergantung pada jenis pelarut, konsentrasi ekstrak, metode uji, dan karakteristik bakteri uji.

Lemahnya aktivitas antibakteri ekstrak terhadap *E. coli* dapat dijelaskan oleh struktur bakteri Gram-negatif. *E. coli* memiliki membran luar yang tersusun dari lipopolisakarida, protein, dan fosfolipid, sehingga dapat membatasi masuknya senyawa antibakteri ke dalam sel. Membran luar tersebut berfungsi sebagai penghalang permeabilitas yang memengaruhi sensitivitas bakteri terhadap antibiotik dan senyawa antimikroba lain (Delcour, 2009). Oleh karena itu, meskipun ekstrak mengandung flavonoid, alkaloid, dan tanin, senyawa tersebut belum tentu mampu berdifusi dan menembus membran luar *E. coli* secara optimal pada konsentrasi yang digunakan.

Berdasarkan analisis statistik deskriptif, jumlah sampel dalam penelitian ini adalah 15 sampel. Nilai rata-rata daya hambat sebesar 10,60 mm dengan simpangan baku 8,526, nilai minimum 6

mm, dan nilai maksimum 27 mm. Simpangan baku yang cukup besar menunjukkan adanya variasi daya hambat antarperlakuan, terutama karena terdapat perbedaan mencolok antara kelompok ekstrak dan kontrol positif.

Hasil uji Kruskal-Wallis menunjukkan nilai $p = 0,07$. Nilai ini lebih besar dari 0,05, sehingga secara statistik tidak terdapat perbedaan bermakna antarperlakuan secara keseluruhan. Namun, hasil uji Mann-Whitney menunjukkan nilai $p = 0,025$, yang mengindikasikan adanya perbedaan pada kelompok perlakuan tertentu. Hasil ini perlu ditafsirkan secara hati-hati karena jumlah replikasi terbatas dan perbedaan zona hambat antar konsentrasi ekstrak relatif kecil.

Secara keseluruhan, ekstrak etil asetat daun kakao menunjukkan potensi antibakteri terhadap *E. coli*, tetapi aktivitasnya masih lemah. Temuan ini mengindikasikan bahwa konsentrasi 60% mulai memberikan efek penghambatan, tetapi belum cukup kuat untuk menghasilkan zona hambat yang besar. Oleh karena itu, penelitian lanjutan diperlukan dengan variasi konsentrasi yang lebih luas, jumlah replikasi yang lebih banyak, serta metode tambahan seperti Minimum Inhibitory Concentration (MIC) dan Minimum Bactericidal Concentration

(MBC). Uji MIC dan MBC penting untuk menentukan konsentrasi terendah yang mampu menghambat atau membunuh bakteri secara lebih akurat dibandingkan hanya menggunakan metode difusi.

PENUTUP

Simpulan

Ekstrak etil asetat daun kakao (*Theobroma cacao* L.) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli*, tetapi aktivitasnya masih tergolong lemah pada rentang konsentrasi yang digunakan. Konsentrasi 20% dan 40% menghasilkan diameter 6 mm, sedangkan konsentrasi 60% menghasilkan zona hambat 8 mm. Kontrol positif amoksisilin menghasilkan zona hambat 27 mm, menunjukkan aktivitas antibakteri yang jauh lebih kuat dibandingkan ekstrak. Hasil uji Kruskal-Wallis menunjukkan nilai $p = 0,07$, sehingga tidak terdapat perbedaan bermakna secara statistik antarperlakuan secara keseluruhan. Namun, hasil uji Mann-Whitney menunjukkan nilai $p = 0,025$, yang mengindikasikan adanya perbedaan pada kelompok perlakuan tertentu. Dengan demikian, ekstrak etil asetat daun kakao berpotensi sebagai antibakteri terhadap *E. coli*, tetapi belum menunjukkan aktivitas optimal.

Saran

Penelitian selanjutnya disarankan menggunakan variasi konsentrasi ekstrak yang lebih luas, terutama konsentrasi di atas 60%, untuk mengetahui konsentrasi optimal yang mampu menghambat pertumbuhan *E. coli*. Jumlah replikasi perlu ditingkatkan agar hasil penelitian lebih stabil dan representatif. Selain itu, perlu dilakukan uji lanjutan menggunakan metode MIC dan MBC untuk menentukan konsentrasi hambat minimum dan konsentrasi bunuh minimum. Proses

fraksinasi atau pemurnian ekstrak juga dapat dipertimbangkan untuk meningkatkan kadar senyawa aktif yang diduga berperan dalam aktivitas antibakteri.

DAFTAR PUSTAKA

- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2024). *About Escherichia coli infection*. <https://www.cdc.gov/ecoli/about/index.html>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2024). *Technical information: E. coli infection*. <https://www.cdc.gov/ecoli/php/technical-info/index.html>
- Delcour, A. H. (2009). Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1794(5), 808–816. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.005>
- Hayati, A. R., Singkam, A. R., & Jumiarni, D. (2022). Uji antibakteri ekstrak etanol daun *Theobroma cacao* L. terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* dengan metode difusi cakram. *BIOEDUSAINS: Jurnal Pendidikan Biologi dan Sains*, 5(1), 31–40. <https://doi.org/10.31539/bioedusains.v5i1.3160>
- Jubair, N., Rajagopal, M., Chinnappan, S., Abdullah, N. B., & Fatima, A. (2021). Review on the antibacterial mechanism of plant-derived compounds against multidrug-resistant bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 6015. <https://doi.org/10.3390/ijms22116015>
- Mandhaki, N., Huda, C., & Putri, A. E. (2021). Aktivitas antibakteri fraksi daun kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. *Jurnal Sains dan Kesehatan*, 3(2), 188–193. <https://doi.org/10.25026/jsk.v3i2.269>
- Maqfirah, Z., Nasution, M. A., Nasution, M. P., & Nasution, H. M. (2023). The determination of total flavonoid content of ethanol extract of ethyl acetate and n-hexane fractions in cocoa (*Theobroma cacao* L.) leaves using UV-Vis spectrophotometry method. *Journal of Pharmaceutical and Sciences*, 6(4), 1534–1543. <https://doi.org/10.36490/journal-jps.com.v6i4.43>
- Shamsudin, N. F., Ahmed, Q. U., Mahmood, S., Ali Shah, S. A., Khatib, A., Mukhtar, S., Alsharif, M. A., Parveen, H., & Zakaria, Z. A. (2022). Antibacterial effects of flavonoids and their structure-activity relationship study: A comparative interpretation. *Molecules*, 27(4), 1149. <https://doi.org/10.3390/molecules27041149>
- World Health Organization. (2023). *Antimicrobial resistance*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>