

Diyantika et al., *Perubahan Morfologi Staphylococcus aureus Akibat Paparan*

Perubahan Morfologi *Staphylococcus aureus* Akibat Paparan Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao*) secara In Vitro

(*The Morphology Change of Staphylococcus Aureus Caused by Ethanolic extracts of Cocoa Beans (Theobroma Cacao) in Vitro*)

Dafista Diyantika¹, Diana Chusna Mufida¹, Misnawi²¹Fakultas Kedokteran, Universitas Jember²Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia

Jln. Kalimantan 37, Jember 68121

e-mail: fista.dyan@yahoo.com

Abstract

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is a positive gram bacteria which often infect human. *S. aureus* is resistant to some antibiotic such as chloramphenicol, ampicillin, erythromycine, penicillin, etc. Ethanolic extracts of cocoa beans can hamper the growth of *S. aureus* in vitro, but the morphological change on *S. aureus* after ethanolic extracts of cocoa beans exposure has not reported yet. This research was aimed at studying the morphology change on *S. aureus* after ethanolic extracts of cocoa beans exposure. The research design was Quasi Experimental with Posttest Only Control Group Design. The sample was *S. aureus* whereas the material tests was ethanolic extracts of cocoa beans in concentration of 31.2 mg/ml; 15.6 mg/ml and 7.8 mg/ml. The negative control was sterile aquadest and the positive control was cephalixin suspension 4 ug/ml. The method for observing the *S. aureus* morphology change was scanning electron microscope. The research result showed that there was a morphological change of *S. aureus* after treatment with ethanolic extracts of cacao seed at 7,8 mg/ml and 15,6 mg/ml, with the enlargement of wall cell and the unity of septum. And at 31,25 mg/ml, there was a protrusion of the wall cell and enlargement of wall cell.

Keywords: Antimicrobial, Cacao, SEM, *Staphylococcus aureus*.

Abstrak

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) adalah bakteri Gram positif yang sering menginfeksi manusia. *S. aureus* resisten terhadap banyak antibiotik misalnya kloramfenikol, ampicilin, eritromisin, penisilin, dll. Ekstrak etanol biji kakao memiliki daya hambat terhadap pertumbuhan *S. aureus* secara in vitro, namun belum dapat ditunjukkan perubahan morfologi yang terjadi pada *S. aureus* setelah diberikan ekstrak etanol biji kakao. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengkaji perubahan morfologi *S. aureus* setelah diberikan ekstrak etanol biji kakao. Jenis penelitian yang digunakan adalah Quasi Experimental dengan rancangan Posttest Only Control Group Design. Sampel yang digunakan adalah *S. aureus* dengan bahan uji yaitu ekstrak etanol biji kakao konsentrasi 31,2 mg/ml; 15,6 mg/ml; dan 7,8 mg/ml sedangkan kontrol negatifnya adalah aquades steril dan kontrol positifnya adalah suspensi sefaleksin 4 µg/ml. Metode yang digunakan untuk pengamatan perubahan morfologi *S. aureus* adalah uji scanning electron microscope. Hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol biji kakao pada konsentrasi 15,6 mg/ml dan 7,8 mg/ml menyebabkan terjadinya perubahan morfologi *S. aureus* berupa pembesaran ukuran diameter sel dan tidak terpisahnya septum. Pada konsentrasi 31,25 mg/ml juga tampak adanya penonjolan pada dinding sel bakteri.

Kata Kunci: Antimikroba, Kakao, SEM, *Staphylococcus aureus*

Pendahuluan

Penyakit infeksi masih menjadi masalah yang mendominasi dalam bidang kesehatan. Penyakit infeksi adalah salah satu penyakit yang penularannya cukup mudah dan dapat disebabkan oleh bakteri, virus, jamur, dan parasit. Salah satu infeksi yang cukup sering dan hampir menyerang semua manusia adalah infeksi oleh *Staphylococcus aureus*. Menurut Tally [1], *S. aureus* merupakan bakteri patogen Gram positif yang mudah tumbuh pada kebanyakan medium bakteriologis dalam keadaan aerob maupun anaerob fakultatif. *Staphylococcus aureus* banyak ditemukan di sekitar lingkungan hidup manusia penyebab penyakit infeksi di dunia. Hal ini disebabkan oleh kemampuan *S. aureus* yang mudah beradaptasi dengan lingkungan melalui ketahanannya terhadap antimikroba yang dimilikinya. Bakteri ini terutama ditemukan pada kulit, kelenjar kulit, selaput lendir, luka dan umumnya merupakan penyebab radang tenggorokan, infeksi kulit (bisul) serta infeksi sistem saraf pusat dan paru-paru. Manifestasi dari infeksi *S. aureus* ini dapat berupa impetigo, *scalded skin syndrome*, pneumonia, osteomyelitis, proktitis, endokarditis, metastasis staphylococcal, keracunan makanan, sindrom syok toksik, meningitis, dan sepsis [2].

Terdapat sekitar 18.650 kasus infeksi oleh *S. aureus* yang mengalami kematian dari 94.000 kasus infeksi yang terjadi secara keseluruhan di Amerika [3]. Infeksi *S. aureus* juga cukup tinggi di Asia, yaitu mencapai 70% pada tahun 2007. Sementara di Indonesia pada tahun 2006 mencapai 23,5% [4].

Solusi untuk mengatasi infeksi oleh *S. aureus* adalah dengan memberikan antibiotik untuk bakteri Gram positif. Namun akhir-akhir ini sudah banyak laporan mengenai resistensi obat. Penyebab terjadinya resistensi antibiotik antara lain karena pemilihan antibiotik yang kurang tepat, pemberian dosis yang kurang adekuat, atau lama penggunaan obat yang tidak disiplin. Resistensi *S. aureus* terhadap antibiotik tertinggi berturut-turut untuk ampicilin, asam-klavulanat, amoksisilin, penisilin G, sulbenisilin, kloramfenikol, dan siprofloksasin [5]. Pola kepekaan kuman *S. aureus* terhadap enam jenis antibiotik di wilayah Jakarta Timur menunjukkan

bahwa kuman ini telah resisten terhadap antibiotik dengan urutan tetrasiklin 53,3%, streptomisin 44,8%, kloramfenikol 23,6%, ampicilin 18,1%, eritromisin 6,6%, dan penisilin 4,2% [5].

MRSA atau *Methicillin-resistant S. aureus* ialah bakteri yang mengalami kekebalan terhadap antibiotik jenis metisilin [6]. Kuman MRSA pada awalnya hanya resisten terhadap antibiotik bercincin β -laktam, namun dalam perkembangannya muncul kekebalan juga terhadap golongan quinolon, aminoglikosida, tetrasiklin, bahkan vankomisin [7]. Akibat tingginya angka resistensi tersebut, perlu dicari obat alternatif untuk infeksi oleh *S. aureus* tersebut. Berbagai bahan antibiotik alami menjadi pilihan solusi terhadap pengobatan oleh infeksi *S. aureus* ini. Salah satu bahan antibiotik alami yang murah dan mudah didapat tersebut adalah polifenol biji kakao.

Tanaman kakao (*Theobroma cacao*) merupakan salah satu tanaman perkebunan yang tumbuh subur di daerah tropis yang berasal dari Amerika Selatan, tepatnya tumbuh di hutan hujan tropis. Produk olahannya yang dikonsumsi oleh manusia adalah coklat. Tanaman kakao terdiri atas akar, batang, daun, bunga, dan buah. Buah kakao terdiri atas tiga komponen terbesar utama yaitu kulit buah, plasenta, dan biji. Biji kakao kaya akan komponen-komponen senyawa fenolik atau polifenolik. Berdasarkan beberapa hasil penelitian didapatkan bahwa polifenol pada biji kakao diketahui mempunyai potensi sebagai bahan antioksidan alami, antara lain mempunyai kemampuan untuk memodulasi sistem imun, efek kemopreventif untuk pencegahan penyakit jantung koroner, dan kanker [8-10]. Selain itu, polifenol kakao bersifat antimikroba terhadap beberapa bakteri patogen dan bakteri kariogenik [11-14]. Senyawa polifenol dalam biji kakao terdiri dari flavonoid, katekin, prosianidin, antosianin, dan tanin kompleks.

Flavan-3-ol (katekin) adalah senyawa polifenol alami dan termasuk dalam penyusun

golongan tanin. Menurut Wahlyuo (2010), katekin memiliki sifat sebagai antimikroba, memperkuat pembuluh darah, melancarkan air seni dan menghambat pertumbuhan sel kanker. Katekin dalam keadaan murni sedikit tidak larut dalam air dingin tetapi sangat larut dalam air panas, alkohol dan etil asetat, namun katekin tidak larut dalam kloroform. Tanin adalah senyawa lain dalam polifenol yang mengganggu permeabilitas sel dengan mengkerutkan dinding sel atau membran sel. Akibat terganggunya permeabilitas sel, sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat atau bahkan mati [15,16].

Flavonoid juga diketahui memiliki kemampuan sebagai antibakteri, antioksidan, antiinflamasi, dan mencegah kanker [16]. Flavonoid dapat menghambat fungsi DNA gyrase bakteri dengan merusak membran sitoplasma dari bakteri dan menyebabkan kerusakan pada dinding sel bakteri [17]. Flavonoid merupakan senyawa polar sehingga akan larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, dan air. Pelarut etanol adalah salah satu pelarut yang lebih menguntungkan karena bersifat polar sehingga dapat melarutkan senyawa polifenol biji kakao.

Berdasarkan penelitian terdahulu, disebutkan bahwa aktivitas antibakteri ekstrak etanol biji kakao terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus* dalam media Muller Hinton dengan menggunakan metode difusi sumuran ditunjukkan dengan adanya zona bening atau zona hambat di sekitar area sumuran yang terbentuk pada konsentrasi 15,6 mg/ml hingga konsentrasi 1000 mg/ml [18]. Walaupun efek antibakteri ekstrak etanol biji kakao telah dapat dibuktikan, namun belum dapat ditunjukkan perubahan morfologi apa yang terjadi pada *S. aureus* setelah dilakukan paparan terhadap ekstrak etanol biji kakao. Sehubungan dengan hal tersebut maka peneliti ingin mengkaji gambaran perubahan morfologi *S. aureus* akibat paparan ekstrak etanol biji kakao secara *in vitro*.

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji perubahan morfologi bakteri *S. aureus* setelah diberikan ekstrak etanol biji kakao pada

konsentrasi 31,25 mg/ml, 15,6 mg/ml dan 7,8 mg/ml secara *in vitro*.

Metode Penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan *Quasi Eksperimental Design* dan rancangan penelitian yang digunakan adalah *Posttest Only Control Group Design*. Metode yang digunakan untuk pengamatan perubahan morfologi bakteri *S. aureus* adalah dengan uji *scanning electron microscope*. Sampel pada penelitian ini adalah koloni bakteri *S. aureus* yang disesuaikan dengan standar 0,5 Mc Farland (10^6 CFU/ml) yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Teknik analisis data yang digunakan adalah menggunakan metode deskriptif. Pada penelitian ini dilakukan 5 perlakuan: 1) *S. aureus* yang diberi aquades steril, 2) *S. aureus* yang diberi ekstrak etanol biji kakao konsentrasi 7,8 mg/ml, 3) *S. aureus* yang diberi ekstrak etanol biji kakao konsentrasi 15,6 mg/ml, 4) *S. aureus* yang diberi ekstrak etanol biji kakao konsentrasi 31,25 mg/ml, 5) *S. aureus* yang diberi suspensi sefaleksin 4µg/ml. Tahapan pada penelitian ini: 1) Pembuatan ekstrak etanol biji kakao dengan metode maserasi 2) Pengamatan perubahan morfologi *S. aureus* dengan *Scanning Electron Microscopy* (SEM)

Pembuatan konsentrasi ekstrak etanol biji kakao

Pembuatan ekstrak etanol biji kakao dilakukan dengan proses maserasi hingga didapatkan 170 gram polifenol serbuk. Serbuk ekstrak etanol biji kakao ditimbang sebanyak 2000 mg kemudian ditambahkan aquades steril panas 2 ml sehingga didapatkan konsentrasi ekstrak etanol biji kakao 1.000 mg/ml kemudian divortex selama 60 detik. Setelah itu larutan tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi I, kemudian dilakukan pengenceran bertingkat dengan kelipatan setengahnya sampai didapatkan larutan konsentrasi 7,8 mg/ml kemudian divortex selama 60 detik. Dari tabung reaksi I diambil sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi II yang sudah diisi dengan 1 ml aquades steril panas kemudian divortex selama 60 detik. Dari tabung reaksi II diambil sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi III yang sudah diisi dengan 1 ml aquades steril panas kemudian divortex selama 60 detik. Beri label pada tabung untuk setiap kali pengenceran sesuai dengan konsentrasinya [19].

Alur penelitian

Ke dalam 5 tabung yang berisi media muller hinton broth dimasukkan masing-masing 100µl aquades steril, 100µl ekstrak etanol biji kakao konsentrasi 7,8mg/ml, 100µl ekstrak etanol biji kakao konsentrasi 15,6mg/ml, 100µl ekstrak etanol biji kakao konsentrasi 31,25mg/ml, dan 100µl suspensi sefaleksin 4µg/ml. Kemudian di vortex selama 60 detik. Selanjutnya ke dalam 5 tabung tersebut masing-masing dimasukkan 10µl suspensi bakteri *S. aureus* yang telah distandarkan dengan larutan 0,5 Mac Farland kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 15-20 jam.

Pengamatan dengan SEM

Setelah diinkubasi 15-20 jam, perlu dilakukan preparasi sampel (membuat sediaan) untuk dilihat dengan menggunakan SEM. Tahapan pembuatan sampel tersebut yaitu: bakteri hasil dari perlakuan tersebut dimasukkan ke dalam larutan fiksasi glutaraldehyde 2% selama 2-3 jam suhu 4°C (sentrifuge dengan kecepatan rendah selama 15 menit). Kemudian sediaan dicuci dengan larutan buffer phosphate pH 7,4 selama 3 x 5 menit suhu 4°C (sentrifuge dengan kecepatan rendah selama 15 menit). Post fiksasi dengan larutan Osmic Acid 1% selama 1-2 jam suhu 4°C (sentrifuge dengan kecepatan rendah selama 15 menit). Kemudian sediaan dicuci dengan larutan buffer phosphate pH 7,4 selama 3 x 5 menit suhu 4°C (sentrifuge dengan kecepatan rendah selama 15 menit). Lalu dehidrasi dengan alkohol bertingkat : 30%, 50%, 70% masing-masing selama 15-20 menit suhu 4°C (sentrifuge dengan kecepatan rendah selama 15 menit). Dilanjutkan dehidrasi dengan alkohol 80%, 90%, absolute dua kali masing-masing selama 15-20 menit suhu ruangan (sentrifuge dengan kecepatan rendah selama 15 menit). Kemudian diganti dengan amyl acetate absolute (sebagai pengawet sampai menunggu waktu pengeringan). Bakteri yang akan dikeringkn dipipet dengan pipet Pasteur dan diteteskan pada gelas objek dengan luas 16 mm² yang sudah dibersihkan dengan alkohol. Kemudian dilakukan pengeringan dengan alat Critical Point Drying (CPD). Setelah itu dilakukan penempelan pada stub dengan menggunakan lem khusus. Langkah berikutnya adalah melakukan pelapisan dengan alat vacuum evaporator dan bahan pelapisnya adalah emas murni atau carbon [20].

Hasil Penelitian

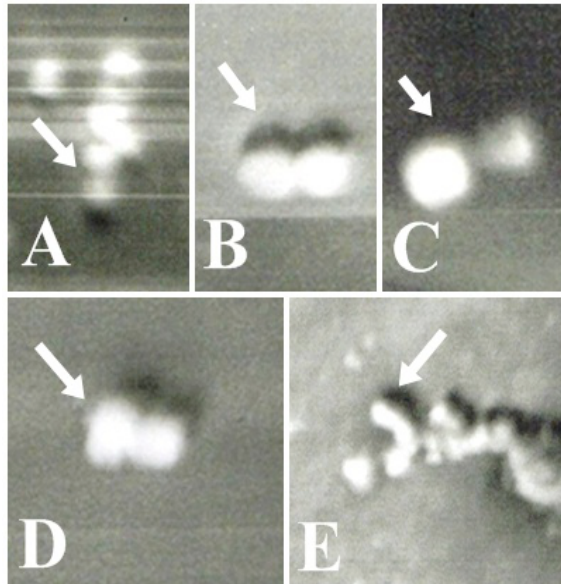
Total polifenol dihitung berdasarkan hasil absorbansi ekstrak polifenol kasar dibagi 0,25 gram bahan yang digunakan untuk analisa. Untuk mengukur total polifenol, terlebih dahulu dilakukan pengukuran berdasarkan standard (+)-katekin dan diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 765 nm. Pada perhitungan tersebut didapatkan hasil pengukuran absorbansi pada (+)-katekin yang direaksikan dengan Follin ciocalteau seperti yang tercantum pada tabel 1 berikut.

Tabel 1. Absorbansi (+)-Katekin

Konsentrasi (mg/ml)	Absorbansi
0	0.0001
100	0.0800
200	0.1194
400	0.2462
600	0.3372
800	0.4046
1000	0.4365

Dari data tersebut dihasilkan kurva katekin dengan persamaan yaitu $Y=4,945335e-04 \cdot x$. Kemudian hasil dari absorbansi sampel ekstrak etanol biji kakao pada penelitian ini dimasukkan ke dalam persamaan tersebut sehingga diperoleh nilai x, lalu dikali 50 sebagai faktor pengenceran lalu dibagi 0,25 gram yang merupakan berat ekstrak yang dianalisa, kemudian dibagi 10.000 untuk dijadikan persentase. Dari perhitungan tersebut diperoleh hasil total polifenol sebesar 21,9% (219 gr/Kg). Sedangkan nilai rendemen dari ekstrak etanol biji kakao ini adalah 2,43%.

Hasil pengamatan perubahan morfologi *S. aureus* akibat paparan ekstrak etanol biji kakao konsentrasi 31,25 mg/ml, 15,6 mg/ml, dan 7,8mg/ml adalah adanya pembesaran ukuran diameter sel dan terbentuknya tonjolan pada permukaan sel bakteri.



Gambar 1. Perubahan morfologi *S. aureus* akibat paparan ekstrak etanol biji kakao

Gambaran *S. aureus* yang tidak diberi perlakuan (gambar A) menunjukkan gambaran yang normal, yaitu : ukuran sel hampir seragam yaitu diameter 0,43µm, bentuk sel utuh bulat (*coccus*) kecil, dinding sel tampak bagus, tebal, berbatas tegas, dan tersusun bergerombol [21].

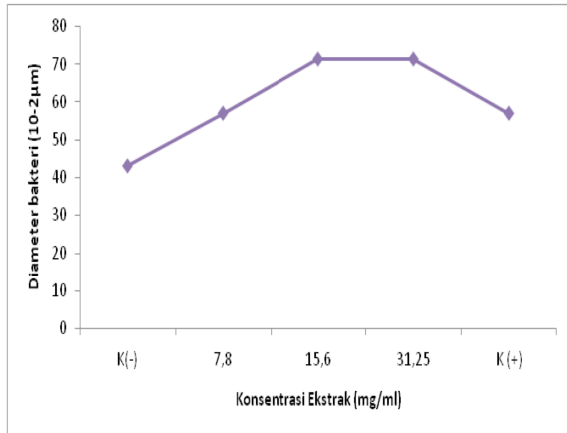
Pada gambaran di atas, tampak *S. aureus* tersusun berkoloni sesuai cara hidupnya namun tidak terlalu banyak bakteri dalam satu koloni sehingga bentukan gerombolan seperti anggur kurang tampak. Gambaran perubahan morfologi *S.aureus* (gambar B) setelah diberi ekstrak etanol biji kakao konsentrasi 7,8 mg/ml. Terjadi pembengkakan pada bakteri sehingga ukuran bakteri *S. aureus* membesar menjadi berdiameter 0,57µm. Dinding sel bakteri tidak menebal ataupun menipis dan permukaan dindingnya tetap rata. Bentuk sel *S. aureus* tampak bulat halus namun terjadi pembesaran ukuran. Selain perubahan tersebut, pada sel septum tetap terpisah jelas dan tidak terjadi penonjolan pada permukaan sel. Perubahan yang tampak pada *S. aureus* yang telah terpapar ekstrak etanol biji kakao konsentrasi 15,6 mg/ml (gambar C) adalah adanya perubahan pada bentuk dan ukuran sel. Pada gambar tersebut tampak adanya pembengkakan pada dinding sel juga perubahan bentuk yang sudah tidak bulat lagi. Ukuran bakteri lebih besar dari normal yaitu diameter 0,714µm. Permukaan dinding ada yang tampak rata dan

ada yang tidak. Sedangkan batas antar dua sel (septum) tidak dapat dinilai karena *S. aureus* pada perlakuan ini susunan selnya terpisah, tidak bergerombol seperti normalnya. Tidak terbentuk tonjolan pada permukaan dinding sel. Gambaran *S. aureus* yang sebelumnya telah diberi ekstrak etanol biji kakao konsentrasi 31,25 mg/ml (Gambar D) tampak adanya pembengkakan pada dinding sel dan perubahan bentuk yang tidak bulat lagi, serta terdapat kerusakan pada dinding sel (membran sel). Bakteri ini memiliki ukuran yang lebih besar dari normal, yaitu diameter 0,714µm. Dinding mengalami sedikit penebalan dan permukaan dinding tidak rata. Tampak terbentuk tonjolan pada permukaan dinding salah satu sel bakteri. Sedangkan *S. aureus* yang sebelumnya telah dikontakkan dengan suspensi antibiotik sefaleksin konsentrasi 4 µg/ml (gambar E) memberikan gambaran adanya pembengkakan pada dinding sel bakteri dan perubahan bentuk. Bentuk *S. aureus* yang secara normal adalah *coccus* pada gambar tampak sudah tidak bulat lagi namun terlihat agak lonjong. Ukuran bakteri membesar menjadi diameter 0,57µm. Dinding sel bakteri tampak ada yang menebal dan ada yang menipis namun permukaan dinding sedikit terlihat tidak rata pada beberapa sel. Terdapat beberapa sel yang memiliki tonjolan pada permukaan dindingnya.

Tabel 1. Diameter *S. aureus* akibat paparan ekstrak etanol biji kakao secara *in vitro*

Konsentrasi Ekstrak (mg/ml)	Diameter <i>S. aureus</i> Foto Positif (mm)	Diameter <i>S. aureus</i> Foto Negatif (mm)	Diameter <i>S. aureus</i> (µm)
K (-)	3	3	0,43
7,8	5,25	2	0,57
15,6	6,5	2,5	0,714
31,25	5,75	2,5	0,714
K (+)	4,25	2	0,57

K (+) : sefaleksin
K (-) : aquades steril



Gambar 2. Grafik hubungan antara konsentrasi ekstrak etanol biji kakao dengan diameter *S. aureus*

Perubahan morfologi *S. aureus* yang diberi aquades steril (kontrol negatif), suspensi sefaleksi 4μg (kontrol positif), dan ekstrak etanol biji kakao konsentrasi 31,25 mg/ml, 15,6 mg/ml, dan 7,8 mg/ml dapat dilihat pada tabel 2 berikut.

Tabel 2. Perubahan morfologi *S. aureus* akibat paparan ekstrak etanol biji kakao

	K (-)	7,8 mg/ml	15,6 mg/ml	31,25 mg/ml	K (+)
Diameter	0,43 μm	0,57 μm	0,714 μm	0,714 μm	0,57 μm
Septum	Terpisah jelas	Terpisah h jelas	Tidak dapat dinilai	Tidak terpisah	Tidak terpisah
Tonjolan	-	-	-	+	-
Bentuk sel	coccus	coccus	coccus	coccus	Pipih

(-) : tidak terbentuk

(+) : terbentuk

Pembahasan

Pada penelitian didapatkan bahwa ekstrak etanol biji kakao dapat memberikan perubahan morfologi yang berarti pada *S. aureus* secara *in vitro*. Hal ini disebabkan oleh polifenol dari ekstrak etanol biji kakao yang bersifat sebagai antibakteri.

Berdasarkan hasil penelitian didapatkan perubahan ukuran yang berbeda diantara 5 sampel yang telah diberi perlakuan. Pada *S. aureus* yang tidak diberi perlakuan didapatkan ukuran sel adalah 0,43μm. Ukuran diameter sel bakteri *S. aureus* yang diberi ekstrak etanol biji

kakao konsentrasi 7,8 mg/ml yaitu 0,57μm, *S. aureus* yang diberi ekstrak etanol biji kakao konsentrasi 15,6 mg/ml yaitu 0,714μm, *S. aureus* yang diberi ekstrak etanol biji kakao konsentrasi 31,25 mg/ml yaitu 0,714μm dan *S. aureus* yang diberi suspensi sefaleksin 4 μg/ml adalah 0,57μm. Berdasarkan hasil tersebut diketahui bahwa pembesaran ukuran *S. aureus* pada penelitian mengalami peningkatan. Ukuran bakteri *S. aureus* yang diberi suspensi sefaleksin 4 μg/ml lebih kecil dibandingkan dengan *S. aureus* yang diberi ekstrak etanol biji kakao konsentrasi 15,6 mg/ml dan 31,25 mg/ml karena bentuk selnya berbeda. Pada *S. aureus* yang diberi ekstrak etanol biji kakao konsentrasi 15,6 mg/ml dan 31,25 mg/ml bentuk selnya bulat dan membesar, sedangkan pada *S. aureus* yang diberi suspensi sefaleksin 4 μg/ml bentuk selnya sedikit lonjong (memipih) sehingga diameter sel lebih kecil.

Staphylococcus aureus yang diberi ekstrak etanol biji kakao konsentrasi 7,8 mg/ml tampak membesar dengan ukuran diameter sel yaitu 0,57μm, namun secara visual pada monitor didapatkan kesan jumlah sel yang tidak jauh berbeda dengan kesan jumlah *S. aureus* yang tidak diberi perlakuan. Sedangkan kesan jumlah *S. aureus* yang diberi perlakuan ekstrak etanol biji kakao konsentrasi 15,6 mg/ml dan 31,25 mg/ml tampak berkurang. Selain adanya penurunan kesan jumlah secara visual pada kedua gambar tersebut, juga didapatkan adanya pembesaran ukuran yaitu 0,714μm pada *S. aureus* yang diberi ekstrak etanol biji kakao konsentrasi 15,6 mg/ml dan adanya tonjolan pada permukaan dinding sel serta pembesaran ukuran sel yaitu 0,714μm pada *S. aureus* yang diberi ekstrak etanol biji kakao konsentrasi 31,25 mg/ml. Dari ketiga gambar tersebut walau tidak didapatkan perubahan morfologi yang tidak berbeda jauh namun dapat disimpulkan bahwa kadar hambat minimum ekstrak etanol biji kakao terhadap pertumbuhan *S. aureus* adalah 15,6 mg/ml.

Terjadinya perubahan morfologi yang tidak berbeda jauh pada tiga konsentrasi tersebut mungkin karena konsentrasi ekstrak yang diberikan terlalu rendah yaitu ½ KHM, KHM, dan 2x KHM sehingga tidak didapatkan perubahan morfologi yang sangat drastis antara masing-masing konsentrasi. Perubahan morfologi yang terjadi adalah akibat ekstrak etanol biji kakao yang mengandung polifenol yang sebagian besar mengandung flavonoid, katekin, prosianidin, antosianin, dan tanin kompleks dimana komponen tersebut diketahui

bersifat sebagai antimikroba. Penelitian secara *in vitro* dan *in vivo* menunjukkan bahwa polifenol biji kakao memiliki antioksidan yang mampu menekan hydrogen peroksida dan anion superoksida, melindungi lemak dari kerusakan oksidasi, bertindak sebagai antiulserik, antimikroba, antikarsinogenik, antimutagenik, menghambat pertumbuhan tumor dan kanker, serta mengurangi penyakit-penyakit karena oksidasi *low density lipoprotein* [22-25].

Polifenol biji kakao yang terdiri dari katekin, tanin, antosianin dan flavonoid ini secara keseluruhan mampu menghambat dan membunuh bakteri dengan mekanisme kerja yang berbeda-beda. *Staphylococcus aureus* yang diberi ekstrak etanol biji kakao konsentrasi 7,8 mg/ml dan 15,6 mg/ml menunjukkan adanya pembesaran ukuran. Pembesaran ukuran ini dapat terjadi akibat pengaruh katekin, tanin, dan flavonoid yang terkandung dalam polifenol. Katekin dapat merusak membran sitoplasma mikroba sehingga menyebabkan kebocoran metabolit penting yang dapat menginaktivasi sistem enzim bakteri. Kandungan polifenol lain yaitu tanin yang mempunyai target pada polipeptida dinding sel dapat menyebabkan kerusakan pada dinding sel. Terjadinya kerusakan pada dinding sel bakteri tersebut menyebabkan sel bakteri menjadi tanpa dinding yang disebut protoplasma [26]. Sehingga akan terjadi kerusakan dinding sel dan menyebabkan kerusakan pada membran sel yang mengakibatkan hilangnya sifat permeabilitas membran sel, sehingga keluar masuknya zat-zat seperti air, nutrisi, dan enzim tidak terseleksi. Polifenol yang bersifat menarik protein juga dapat menyebabkan pembesaran ukuran ini.

Sedangkan pada *S. aureus* yang mendapatkan ekstrak etanol biji kakao konsentrasi 31,25 mg/ml selain terjadi pembesaran ukuran, terdapat sel yang mengalami penonjolan pada permukaan selnya. Perubahan yang terjadi karena sifat polifenol yang merusak dinding sel sehingga material-material di dalam sel dapat mudah keluar. Flavonoid yang dapat menghambat fungsi DNA gyrase juga dapat menjadi penyebab terjadi penonjolan tersebut. Penghambatan pada fungsi DNA gyrase dilakukan dengan merusak membran sitoplasma bakteri yang terdiri atas lipid dan asam amino dengan mereaksikannya dengan gugus alkohol pada senyawa flavonoid. Proses ini akan menyebabkan dinding sel rusak sehingga senyawa tersebut dapat masuk ke dalam inti sel bakteri yang dapat mengubah bentuk sel bakteri tersebut. Selanjutnya

senyawa tersebut kontak dengan DNA pada inti sel bakteri. Perbedaan kepolaran antara lipid penyusun DNA dengan gugus alkohol pada senyawa flavonoid tersebut akan menyebabkan rusaknya struktur lipid dari DNA bakteri sehingga bakteri akan mengalami lisis dan mati [27].

Tidak terpisahnya septum dapat terjadi karena pengaruh tanin yang terdapat dalam polifenol. Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri berhubungan dengan kemampuannya menginaktivasi adhesi sel mikroba (molekul yang menempel pada sel inang) yang terdapat pada permukaan sel, enzim yang terikat pada membran sel dan polipeptida dinding sel [30]. Sehingga tidak terjadi pemisahan septum yang sempurna. Pada *S. aureus* yang resisten terhadap metisilin dapat ditemukan 14 coccus dengan septum yang tidak terpisah setelah diberi ekstrak air teh hijau (*Camellia sinensis*) konsentrasi 256 µg/l ($1/2$ MIC).

Sehingga perubahan morfologi bakteri *S. aureus* yang sudah dapat dibuktikan pada pemberian ekstrak etanol biji kakao konsentrasi 31,25 mg/ml, 15,6 mg/ml, dan 7,8 mg/ml terhadap *S. aureus* semakin memperkuat bukti bahwa ekstrak etanol biji kakao memiliki daya antibakteri terhadap *S. aureus* secara *in vitro*.

Simpulan dan Saran

Ekstrak etanol biji kakao pada konsentrasi 15,6 mg/ml dan 7,8 mg/ml menyebabkan terjadinya perubahan morfologi *S. aureus* berupa pembesaran ukuran diameter sel dan tidak terpisahnya septum. Pada konsentrasi 31,25 mg/ml juga tampak adanya penonjolan pada dinding sel bakteri.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang uji aktivitas antibakteri ekstrak biji kakao terhadap *S. aureus* dengan metode pelarut yang lain dan uji *in vivo*, serta perubahan morfologi *S. aureus* akibat paparan ekstrak etanol biji kakao secara *in vitro* dengan metode TEM (*Transmission Electron Microscope*).

Daftar Pustaka

- [1] Ernawati K, Yulinery T, Hardiningsih R, Triana E, Napitupulu RNR. Daya Anti *Staphylococcus aureus* dari Fermentasi Daun Beberapa Jenis Tumbuhan Obat. J. Biol. Indon, 2005; 3(9) : 397-404.
- [2] Khusnan, Siti IOS, Soegiyono. Isolasi, Identifikasi dan Karakterisasi Fenotip Bakteri

- Staphylococcus aureus* dari Limbah Penjualan dan Karkas Ayam Potong. *Jurnal Veteriner*, 2008; 9(1): 45-51.
- [3] Todar K. *Staphylococcus and Staphylococcal Diseases*. 2008 [serial online]. <http://www.textbookofbacteriology.net>. [9 April 2009]
- [4] Farmacia. 4th symposium of Indonesia Antimicrobial Resistance Watch. 2007 [serial online]. <http://www.majalah-farmacia.com>. [19 Desember 2011].
- [5] Refdanita. 2004. Pola Kepekaan Kuman terhadap Antibiotika Di Ruang Rawat Intensif Rumah Sakit Fatmawati Tahun 2001-2002. *Mak. Kes*. 2004; 8(2): 41-48.
- [6] Denis O, Jans B, Deplano A. Epidemiology of MRSA Among Residents of Nursing in Belgium. Department of Microbiology. Erasmus Hospital Brussei; Belgia, 2007: 1-4
- [7] Wang L, Barrett JF. Control and Prevention of MRSA Infections. Dalam: Yinduo Ji (editor), *Methods in Molecular Biology: Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Protocols*. Totowa-New Jersey; Humana Press Inc., 2007: 209-220.
- [8] Othman K, Miyazakil K, Shimura I, Okuda J, Matsumoto M, Oshima T. 2001, Identification of Cariostatic Substances in The Cacao Bean Husk: Their Antiglucosyltransferase and Antibacterial Activities. *Dent. Res*, 2001; 90(11): 2000-2004.
- [9] Tally FP. *Staphylococci: abscesses and other diseases*. Dalam: Schaechter, M. (ed.) *Mechanism of Microbial Diseases*. 2nd Ed. Williams and Wilkins, USA. 1993. h. 187-197.
- [10] Kim H, Keeney PG. Method of Analysis for (-) Epicatechin in Cocoa Beans by High Performance Liquid Chromatography. *Int. J. Food Sci*. 1983; 48(2): 548-551.
- [11] Osawa K, Miyazakil K, Shimura I, Okuda J, Matsumoto M, Oshima T, 2001. Identification of Cariostatic Substances in the Cacao Bean Husk: Their Antiglucosyltransferase and Antibacterial Activities. *Dent. Res*. 2001; 80(11): 2000-2004.
- [12] Brooks, G. H., Janet, J. S., & Morse, A. S. 2004. *Mikrobiologi Kedokteran Jawet*, Melnick dan Adelberg. Edisi 23. Alih Bahasa oleh Hartanto et al. 2007. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- [13] Campbell NA. *Biology*. Alih Bahasa Wasmen Manalu et al. Jakarta : Penerbit Erlangga. 2000
- [14] Belitz HD, Groch W. *Food Chemistry*. New York: Springer-Verlag Berlin. 1999.
- [15] Waluyo L. *Mikrobiologi Umum*. Malang: Umm Press. 2011.
- [16] Ajizah. Sensitivitas *Salmonella typhimurium* terhadap Ekstrak Daun *Psidium guajava* L. *Bioscientiae*, 2004; 1(1): 31-38.
- [17] Stauth D. *Studies force New View on Biology of Flavonoids*. 2007. Oregon: Oregon State University. <http://eurakalert.org.htm>. [1 November 2011].
- [18] Gemmel CG, Lorian V, Effects of low concentration of antibiotics on bacterial ultrastructure, virulence and susceptibility to immunodefence: clinical significance, di dalam: V. Lorian, *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Fouth ed. Williams & Wilkins, London. 1996.
- [19] Tamarizki M. Uji Daya Antibakteri Ekstrak Polifenol Biji Kakao (*Theobroma cacao*) terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Secara In Vitro. *Jember*. 2011.
- [20] Suswati E, Mufida D, Petunjuk Praktikum Mikrobiologi. *Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember*. 2009.
- [21] Dunlap M, Adaskaveg JE. *Introduction to the Scanning Electron Microscope Theory, Practice & Procedures*. Facility for advanced instrumentation: U.C. Davis. 1997.
- [22] Lavlinesia. *Kajian Pola dan Mekanisme Inaktivasi Bakteri Oleh Ekstrak Etil Asetat Biji Atung (Parinarium glaberimum HASSK)*. IPB Bogor. 2007.
- [23] Kattenberg HR. *Nutritional Function of Cocoa and Chocolate. The Manufacturing Confectioner*. 2000; 80(2): 33-37.
- [24] Osakabe N, Yamagishi M, Sanboghi C. Effects of Polyphenol Substances Derived from *Theobroma Cacao* on Gastric Mucosal Lesion Induced by Methanol. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 1998A; 62(1): 1535-1538.
- [25] Osakabe N, Yamagishi M, Sanboghi C. The Antioxidative Substances in Cacao liquor. *Journal of Nutrition Science and and Vitaminology*. 1998B; 44(2): 313-321.
- [26] Osakabe N, Yamagishi M, Natsume. Antioxidative Polyphenolic Substances in Cacao Liquor. pp. 88-101. In: T.H.Parliament; Chi-tang Ho and P. Schieberle, *Caffeinated Beverages; Health Benefits, Physiological Effects and Chemistry*, ACS Symposium Series. 2000; 754.
- [27] Jawetz E, Melnick, Adelberg EA. *Mikrobiologi Kedokteran*. Terjemahan Staf

Pengajar Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dari Medical Microbiology. Jakarta: EGC. 2008: h.225-232.

- [28] Klainer AS. The normal and abnormal surface morphology of Staphylococci. di dalam: W.W. Yotis (ed). *Recent Advances in Staphylococcal Research*. Published by the New York Academy of Sciences. 1974.

- [29] Jambang, N. 2004. "Study Aktivitas Antibakteri dan Antioksidan pada 10 Merk Teh Hitam yang Beredar di Pasaran Kota Malang". Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jurusan Teknologi Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya Malang. 2004.