p-ISSN: 1907-8056
e-ISSN: 2527-5410
AGROINTEK
Jurnal Teknologi Industri Pertanian
journal homepage: journal.trunojoyo.ac.id/agrointek

Aktivitas antibakteri ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L.) kering terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

Elazmanawati Lembong[1*], Gemilang Lara Utama Saripudin[1], Tita Rialita[1], Shobir Muntahal[2], Awaly Ilham Dewantoro[2**]

[1]*Teknologi Pangan, Universitas Padjadjaran, Jatinangor, Indonesia*
[2]*Teknologi Agroindustri, Universitas Padjadjaran, Jatinangor, Indonesia*

Article history
Diterima:
14 Januari 2025
Diperbaiki:
9 Agustus 2025
Disetujui:
19 September 2025

Keyword
Antibacteria;
Cocoa;
Fermentation;
Minimum inhibition concentration;
Phytochemistry;

ABSTRACT

Indonesia is a country with the largest cocoa (Theobroma cacao L.) producer in the world. One of the qualities of cocoa beans is determined by the fermentation process, but the production of cocoa beans in Indonesia is mostly unfermented. Unfermented cocoa beans contain bioactive and antibacterial compounds such as alkaloids, flavonoids, phenolics, tannins, and saponins that can inhibit the growth of microorganisms. This study was aimed to determine the antibacterial activity of unfermented ethanol extract of cocoa beans with concentrations of 1 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL, 20 mg/mL and 40 mg/mL to the Diameter of the Inhibitory Power, Minimum Inhibitory Concentration (MIC), and Minimum Killing Concentration (MBC) which were tested on Escherichia coli and Staphylococcus aureus bacteria. The research method used was experimental with a completely randomized and descriptive design. The results showed that the highest average diameter of the inhibition zone for E. coli was 6.167 mm and 4.583 mm for S. aureus with an extract concentration of 40 mg/mL. The diameter of the inhibition zone formed in the test bacteria was classified as low in the concentration variation. However, the extract with a concentration of 40 mg/mL on E. coli was moderate. The MIC value for E. coli was 1 mg/mL and for S. aureus was 0.5 mg/mL. The MBC values for E. coli and S. aureus bacteria were 20 mg/mL and 10 mg/mL.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

[*] Penulis korespondensi
Email : elazmanawati.lembong@unpad.ac.id
[**] Penulis korespondensi
Email : mail.dewantoro@gmail.com
DOI 10.21107/agrointek.v20i3.28849

PENDAHULUAN

Kakao, tanaman tropis yang memiliki nama ilmiah *Theobroma cacao* L., menghasilkan biji yang menjadi bahan utama dalam produksi cokelat komersial. Indonesia termasuk ke dalam empat besar negara produsen kakao dengan kontribusi hingga 15,8% terhadap permintaan global (BPS (2024) dan Agbolosoo et al. (2024). Nilai kontribusi tersebut diketahui menurun dari tahun-tahun sebelumnya karena adanya alih fungsi lahan dan umumnya biji kakao yang diperdagangkan tidak difermentasi, sehingga menurunkan produktivitas dan nilai jualnya. Faktanya, mutu biji dan harga di pasar internasional mengacu pada proses dan hasil dari tahapan fermentasi (Manalu 2019). Tahapan ini sangat penting dalam proses pengolahan kakao karena dapat memengaruhi mutu dari biji kakao yang dihasilkan.

Sekitar 10% kandungan biji kakao diwakili oleh senyawa fenolik dari total konstituen yang mengandung proantosianidin, flavonol atau flavan-3-ol dan antosianin. Alkaloid, flavonoid, fenolik, tanin, dan saponin merupakan beberapa komponen fitokimia yang terdapat pada ekstrak etanol biji kakao (Chusniasih and Tutik 2021). Sifat antibakteri dapat berasal dari kandungan bahan kimia bioaktif tanaman yang merupakan molekul metabolit sekunder (Abballe et al. 2021). Salah satu masalah kesehatan manusia yang dapat diatasi oleh antibiotik adalah diare yang disebabkan oleh bakteri tertentu, seperti *Staphylococcus aureus* atau *Escherichia coli*, serta penyakit ini diketahui berpotensi mengakibatkan kematian (Fitri and Rahayu 2018).

Konsentrasi ekstrak etanol biji kakao akan menentukan aktivitasnya terhadap bakteri. Dengan demikian, proses ekstraksi etanol biji kakao dapat dijadikan cara alternatif untuk mendapatkan senyawa bioaktifnya sekaligus menjadi sarana yang bermanfaat guna mengobati penyakit yang disebabkan oleh bakteri seperti *S. aureus* dan *E. coli*.

METODE

Bahan dan Alat

Buah kakao matang varietas Forastero diambil dari perkebunan di Kelurahan Kota Kulon, Sumedang (ketinggian kebun berada pada 485 mdpl). Isolat bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* yang tersedia di Laboratorium Mikrobiologi Pangan, Fakultas Teknologi Industri Pertanian, Universitas Padjadjaran. Adapun bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian meliputi $BaCl_2$, pereaksi Dragendorff, etanol, $FeCl_3$, H_2SO_4, HCl, NaCl, NaOH, $K_2Cr_2O_7$, kloramfenikol, Mueller-Hinton agar (MHA), *nutrient agar* (NA), *nutrient broth* (NB), dan TTC (2,3,5-*triphenyltetrazolium chloride).*

Ekstraksi Biji Kakao

Biji kakao disortasi dan dibersihkan, lalu dikeringkan dengan sinar matahari selama 5 hari (Ariyanti 2017). Biji kakao yang sudah kering kemudian dihaluskan dan direndam dengan menggunakan pelarut etanol 70% dengan rasio bahan-ke-pelarut 1:10 (b/v) dan disimpan selama 24 jam di dalam wadah yang dilapisi aluminium foil (prosedur modifikasi dari Dewantoro et al. (2022)). Hasil ekstrak disaring menggunakan kertas Whatman dan bantuan pompa vakum, lalu diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* selama 3 jam dengan suhu 30–40°C.

Uji Bebas Alkohol (Priamsari and Rokhana 2020)

Ekstrak etanol biji kakao sebanyak 1 mL dipipet ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1 mL $K_2Cr_2O_7$. Pengamatan kemudian dilakukan terhadap perubahan warna dari jingga menjadi hijau kebiruan yang mengindikasikan ekstrak masih mengandung alkohol (sisa pelarut ekstraksi).

Skrining Fitokimia

Uji Alkaloid (Tjandra et al. 2020)

Ekstrak biji kakao sebanyak 1 mL direaksikan dengan 1 mL HCl 37% dan 1-2 tetes pereaksi Dragendroff dalam tabung reaksi. Hasil positif yang mengindikasikan adanya kandungan alkaloid ditandai dengan adanya endapan merah bata atau warna jingga.

Uji Flavonoid (Ichsani et al. 2021)

Ekstrak sebanyak 1 mL ditambahkan ke dalam tabung reaksi, kemudian diikuti dengan 1 mL NaOH 2 M. Kandungan flavonoid ditunjukkan dengan munculnya warna kuning pada lapisan amil campuran larutan uji.

Uji Fenolik (Ningsih et al. 2020)

Ekstrak sebanyak 1 mL direaksikan dengan 3 tetes larutan $FeCl_3$ 1% dalam tabung reaksi. Perkembangan warna hijau atau merah

mengindikasikan hasil yang positif dan adanya senyawa fenolik yang terkandung dalam ekstrak.

Uji Tanin (Manongko et al. 2020)

Ekstrak biji kakao sebanyak 1 mL ditambahkan dengan 2–3 tetes $FeCl_3$ 1% ke dalam tabung reaksi. Hasil positif yang menandai adanya senyawa tanin ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi hijau tua.

Uji Saponin (Chakraborty et al. 2017)

Ekstrak sebanyak 1 mL direaksikan dengan 3 mL akuades panas dalam tabung reaksi. Campuran sampel uji dikocok cepat dan dicatat konsistensi dan durasi buih yang terbentuk. Ekstrak positif mengandung senyawa saponin sehingga buih dapat bertahan selama 5 menit.

Uji Diameter Daya Hambat (Sastrawan et al. 2020)

Media MHA dituangkan pada cawan petri secara aseptis dan didiamkan sampai mengental, kemudian ditambahkan 100 µL suspensi koloni bakteri umur 24 jam setara McFarland 0,5 dengan menggunakan mikropipet. Suspensi bakteri diratakan dengan *glass spreader*. *Paper disc* direndam dalam cawan petri pada masing-masing konsentrasi ekstrak etanol biji kakao sekitar 10 menit, lalu diletakkan setiap cawan dengan pinset steril sebelum menutup dan melapisinya dengan *cling wrap*. Cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama dua puluh empat jam. Diameter zona bening diukur menggunakan penggaris.

Uji Konsentrasi Hambat Minimum (Assauqi et al. 2023)

Suspensi bakteri 24 jam yang sebanding dengan 0,5 McFarland dipindahkan ke 100 µL dalam 9,9 mL media NB mempergunakan pipet untuk mendapatkan suspensi bakteri dengan jumlah koloni 1–2 × 10^6 CFU/mL. Pada *microplate* ditambahkan masing-masing 50 µL ekstrak dari konsentrasi terendah hingga tertinggi, kontrol positif, serta kontrol negatif. Pada *microplate* ditambahkan 50 µL suspensi bakteri pada masing-masing sumuran uji ekstrak etanol biji kakao berbagai konsentrasi, kontrol positif serta negatif. Pada *microplate* ditambahkan 100 µL suspensi bakteri sebagai kontrol pertumbuhan, dan media NB sebagai kontrol media. *Microplate* diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Menambahkan 20 µl indikator warna TTC (2,3,5-*triphenyltetrazolium chloride*) 0,2 mg/mL yang telah dilarutkan dengan akuades steril pada setiap sumuran uji. Selama satu jam, *microplate* diinkubasi pada suhu 37°C. Diamati adanya perubahan warna merah, yang mengindikasikan adanya pertumbuhan bakteri. KHM ditemukan dengan konsentrasi terendah yang tidak memperlihatkan perubahan warna.

Uji Konsentrasi Bunuh Minimum (Sony et al. 2025)

Konsentrasi yang menunjukkan KHM dan yang berada di atas KHM diambil dengan menggunakan jarum ose, kemudian digoreskan pada cawan petri berisi 15 mL media MHA yang sudah memadat. Selama lima kali berturut-turut, cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C. KBM adalah sebutan yang diberikan pada cawan petri yang tidak menumbuhkan bakteri.

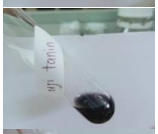
HASIL DAN PEMBAHASAN

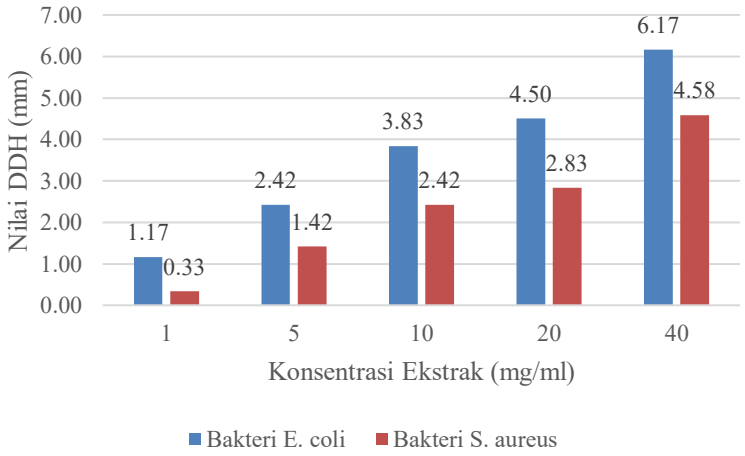
Skrining Fitokimia

Adapun komponen yang telah dievaluasi antara lain alkaloid, flavonoid, fenolik, tanin, serta saponin. Hasil skrining fitokimia ditampilkan pada Tabel 1.

Ekstrak biji kakao kering menunjukkan adanya endapan merah bata pada sampel uji setelah ditambahkan HCl dan pereaksi Dragendorff.. Fenomena ini menunjukkan bahwa ekstrak mengandung senyawa alkaloid (Mardiah and Nuraskin 2022). Logam bismut nitrat serta kalium iodida, yang terdapat dalam pereaksi Dragendorff ini, membentuk kompleks kalium-alkaloid yang dapat membentuk ikatan dengan nitrogen dalam alkaloid biji kakao dan dapat mengendap sebagai zat berwarna cokelat muda atau kekuningan (Zhang et al. 2021). Adapun pergeseran warna sampel uji menjadi hijau atau kuning pada lapisan amil setelah penambahan NaOH mengindikasikan adanya flavonoid dalam ekstrak etanol biji kakao kering (Rahayu et al. 2023). Selain itu, ekstrak etanol terbukti mengandung senyawa fenolik karena terjadinya perubahan warna menjadi biru setelah ekstrak ditambahkan $FeCl_3$ (Ramayani et al. 2021). Tanin merupakan senyawa organik kompleks yang mampu mengendapkan protein, dan dalam penelitian ini ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi biru kehitaman akibat adanya reaksi antara gugus hidroksilnya dengan larutan $FeCl_3$ (Fatonah et al. 2021).

Tabel 1 Skrining Fitokimia

Skrining Fitokimia	Hasil	Gambar	Keterangan
Alkaloid	+		Terdapat endapan merah bata atau warna jingga
Flavonoid	+		Terdapat warna merah, hijau, atau kuning pada lapisan amil
Fenolik	+		Terdapat warna hijau atau hijau biru
Tanin	+		Terdapat warna hijau kehitaman
Saponin	+		Terdapat buih yang menetap selama 5 menit



Gambar 1 Nilai DDH Pada Bakteri Uji

Adanya buih pada ekstrak etanol biji kakao mengindikasikan adanya bahan kimia saponin, berdasarkan hasil uji saponin. Wowor et al. (2022) menjelaskan bahwa adanya gugus hidrofilik pada senyawa saponin yang menarik air, sedangkan gugus hidrofobik yang menarik udara, menyebabkan buih akan terbentuk ketika sesuatu dikocok dengan kuat.

Diameter Daya Hambat (DDH)

Ekstrak etanol biji kakao, dengan konsentrasi dalam kisaran 1 hingga 40 mg/mL, mempunyai kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Ini dibuktikan dengan terbentuknya zona hambat pada daerah sekitar *paper disc*, seperti yang terlihat pada hasil uji DDH yang dilakukan dengan menggunakan metode difusi agar Kirby-Bauer. Gambar 1 memperlihatkan hasil pengujian tersebut.

Berdasarkan Gambar 1, diketahui bahwa pemberian variasi konsentrasi ekstrak etanol biji kakao memberikan pengaruh terhadap pertumbuhan bakteri (Lagha et al. 2021). Pada bakteri *E. coli,* konsentrasi ekstrak 40 mg/mL menghasilkan nilai DDH paling tinggi dan berbeda secara signifikan, yaitu dengan rata-rata sebesar 6,17 mm. Konsentrasi 1 mg/mL menghasilkan zona hambat dengan nilai diameter paling kecil yang memiliki rerata sebesar 1,7 mm. Pada kasus *S. aureus*, konsentrasi ekstrak 40 mg/mL menghasilkan daerah hambat terendah,

dengan rerata DDH sebesar 4,58 mm. Konsentrasi 1 mg/mL menghasilkan zona hambat yang kecil dengan rerata DDH sekitar 0,33 mm.

Ekstrak etanol biji kakao, pada konsentrasi mulai dari 1 hingga 20 mg/mL, memperlihatkan efek penghambatan yang buruk terhadap bakteri *E. coli*. Ini ditentukan oleh pembentukan zona hambat difusi dengan diameter ≤5 mm, menempatkannya dalam kelompok lemah (Hossain 2024). Ketika ekstrak hadir pada konsentrasi 40 mg/mL, ekstrak ini mampu menciptakan zona hambat berukuran 6,17 mm. Pengukuran ini termasuk dalam kategori sedang (Hossain 2024). Ekstrak etanol biji kakao memperlihatkan aktivitas sedang terhadap bakteri uji *S. aureus* dengan dosis mulai dari 1 hingga 40 mg/mL, yang diindikasikan dengan terbentuknya zona hambat berdiameter ≤ 5 mm.

Zat antibakteri bioaktif adalah alasan di balik penghambatan ekstrak biji kakao terhadap bakteri. Sánchez et al. (2024) menjelaskan bahwa zat-zat bioaktif tersebut terdiri dari tanin, alkaloid, flavonoid, fenolat, dan saponin. Dinding sel bakteri yang rusak, permeabilitas sel yang berubah, produksi protein dan asam nukleat yang terganggu, dan sistem enzim yang terhambat merupakan beberapa mekanisme penghambatan antibakteri (Zhou et al. 2022).

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Berdasarkan hasil pada Tabel 2, bakteri *E. coli* memperlihatkan perubahan warna pada konsentrasi 0,1 mg/mL dan 0,5 mg/mL, yang mengindikasikan bahwa aktivitas bakteri masih ada. Hasilnya, nilai KHM bakteri *E. coli* berada pada konsentrasi 1 mg/mL, karena tidak ada perubahan warna menjadi merah pada konsentrasi tersebut (Chen et al. 2016). Pada konsentrasi 0,1 mg/mL, bakteri *S. aureus* mengalami perubahan warna menjadi merah. Tidak ada perubahan warna pada konsentrasi antara 0,5 dan 40 mg/mL. Adapun Kowalska-Krochmal and Dudek-Wicher (2021) menjelaskan bahwa nilai KHM didefinisikan sebagai konsentrasi terendah di mana pertumbuhan bakteri dapat dihambat, maka nilai KHM pada bakteri *S. aureus* yaitu 0,5 mg/mL.

Temuan-temuan ini terjadi akibat perbedaan arsitektur dinding sel *S. aureus* dan *E. coli*. Tabel 3 menampilkan nilai penghambatan dan KHM ekstrak etanol biji kakao terhadap kedua spesies bakteri tersebut. Kerentanan sel bakteri terhadap bahan kimia aktif dapat dipengaruhi oleh variasi dinding selnya (Smułek and Kaczorek 2022). Akibat jenis arsitektur yang berbeda dapat mempengaruhi ketahanan sel bakteri, maka permeabilitas membran setiap bakteri pun berbeda-beda (Mulyatni et al. 2016).

E. coli merupakan bakteri yang termasuk dalam kelompok Gram negatif serta memperlihatkan tingkat resistensi sedang terhadap zat antibakteri karena dapat menahan agen antibakteri yang relatif lambat saat menembus membran luar (Afifah et al. 2025). Lapisan luar ini yaitu lipopolisakarida dan lipoprotein, dapat melindungi sel dari enzim yang dapat menghancurkan dinding sel bakteri (Zhou et al. 2022). *S. aureus* adalah bakteri Gram positif dengan struktur dinding sel yang tidak serumit bakteri Gram negatif. Bentuk dinding sel yang tidak rumit memudahkan infiltrasi zat bioaktif (Nikolic and Mudgil 2023).

Tabel 2 Pengujian KHM

Bakteri		Konsentrasi (mg/mL)							Kontrol				
		0,1	0,5	1	5	10	20	40	+	-	B	NB	NB
E. coli	I	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
	II	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	III	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
S. aureus	I	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
	II	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
	III	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-

Keterangan:
(-) Tidak terdapat perubahan warna ditandai terjadi penghambatan
(+) Perubahan warna menjadi merah ditandai tidak ada penghambatan
Kontrol + = Kloramfenikol 10%
Kontrol - = Akuades steril
B = Bakteri uji
NB = Media *nutrient broth*

Tabel 3 Pengujian KBM

Bakteri	Ulangan	Konsentrasi (mg/mL)				
		1	5	10	20	40
E. coli	I	+	+	+	-	-
	II	+	+	+	-	-
	III	+	+	+	-	-
S. aureus	I	+	+	-		
	II	+	+	-		
	III	+	+	-		

Keterangan:
(-) Jernih dan tidak ditumbuhi bakteri
(+) Terdapat pertumbuhan bakteri

Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM)

Tabel 3 menyajikan nilai KBM terhadap dua jenis bakteri yang pertumbuhannya dihambat dalam penelitian ini. Pada *bakteri E. coli*, terdapat 2 konsentrasi KBM yang menunjukkan kejernihan, yaitu 20 mg/mL serta 40 mg/mL. Nilai KBM ditentukan dengan konsentrasi ekstrak terkecil yang menunjukkan kejernihan, sehingga nilai minimum untuk membunuh bakteri *E. coli* adalah 20 mg/mL, sedangkan nilai KBM bakteri *S. aureus* dievaluasi pada konsentrasi ekstrak 10 mg/mL (Khofifah et al. 2025).

KESIMPULAN

Kesimpulan yang didapat dari penelitian ini adalah bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak dapat meningkatkan nilai DDH. Konsentrasi 40 mg/mL menghasilkan nilai DDH tertinggi, yaitu 6,17 mm pada bakteri *E. coli* dan 4,58 mm pada bakteri *S. aureus*. Nilai KHM untuk bakteri *E. coli* dan *S. aureus* masing-masing adalah 1 mg/mL dan 0,5 mg/mL. Nilai KBM untuk bakteri *E. coli* adalah 20 mg/mL, tetapi untuk bakteri *S. aureus* adalah 10 mg/mL.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Dekan Fakultas Teknologi Industri Pertanian Universitas Padjadjaran atas dukungan fasilitas yang diberikan untuk penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Abballe, C., F. M. L. Gomes, B. D. Lopes, A. P. F. de Oliveira, M. I. Berto, P. Efraim, and S. A. V. Tfouni. 2021. Cocoa beans and derived products: Effect of processing on polycyclic aromatic hydrocarbons levels. Lwt 135:110019. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110019

Afifah, S. H., E. Apriliana, G. Setiawan, and K. N. Berawi. 2025. Antibacterial Activity of Green Tea Epigallocatechin Gallate (EGCG) on Gram Positive and Gram Negative Bacteria. Medical Profession Journal of Lampung 14(12):2330–2335.

Agbolosoo, J. A., D. C. Midamba, I. Massaquoi, and R. M. Sari. 2024. Influential Factors of Indonesian Cocoa Export: Evidence from FMOLS and DOLS Approaches. International Journal of Agricultural Economics 9(6):295–305. https://doi.org/10.11648/j.ijae.20240906.12

Ariyanti, M. 2017. Karakteristik Mutu Biji Kakao (Theobroma cacao L) dengan Perlakuan Waktu Fermentasi Berdasar SNI 2323-2008. Jurnal Industri Hasil Perkebunan 12(1):34–42. https://doi.org/10.33104/jihp.v12i1.2757

Assauqi, N. F., M. Hafshah, and R. N. Latifah. 2023. Penentuan Nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) Ekstrak Etanol Daun Pandan (Pandanus Amaryllifolius Roxb) Terhadap Bakteri Streptococcus Mutans. JC-T (Journal Cis-Trans): Jurnal Kimia dan Terapannya 7(1):1–9. https://doi.org/10.17977/um0260v7i12023p001

BPS. 2024. *Statistik Kakao Indonesia 2023*.

Chakraborty, S., S. Sahoo, A. Bhagat, and S. Dixit. 2017. Studies on Antimicrobial Activity, Phytochemical Screening Tests, Biochemical Evaluation of Clitorea Ternatea Linn. Plant Extracts. International Journal of Research - GRANTHAALAYAH 5(10):197–208. https://doi.org/10.29121/granthaalayah.v5.i10.2017.2296

Chen, C., F. Qu, J. Wang, X. Xia, J. Wang, Z. Chen, X. Ma, S. Wei, Y. Zhang, J. Li, M. Gong, R. Wang, H. Liu, Z. Yang, Y. Li, Y. Zhao, and X. Xiao. 2016. Antibacterial effect of different extracts from Wikstroemia indica on Escherichia coli based on microcalorimetry coupled with agar dilution method. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry 123:1583–1590. https://doi.org/10.1007/s10973-015-4999-9

Chusniasih, D., and T. Tutik. 2021. Identification phytochemical compound of ethanol and acetone extract of Cocoa Pods (Theobroma cacao L.) using GC-MS. Journal of Physics: Conference Series 1882:012103. https://doi.org/10.1088/1742-6596/1882/1/012103

Dewantoro, A. I., S. H. Putri, and E. Mardawati. 2022. Analisis kualitatif kandungan senyawa polifenol pada daun herba kitolod (Hippobroma longiflora (L.) G.Don) dan potensi pemanfaatannya sebagai sumber polifenol alami. Agrointek, Jurnal Teknologi Industri Pertanian 16(3):412–419. https://doi.org/10.21107/agrointek.v16i3.13235

Fatonah, R., S. Mulyaningsih, and C. Ardiana. 2021. Penentuan Kadar Total Tanin dari Ekstrak Daun Binahong (Anredera cordifolia). Jurnal Life Science 3(2):53–65. https://doi.org/10.31980/lsciences.v3i2.1716

Fitri, W. N., and D. Rahayu. 2018. Akitivitas Antibakteri Ekstrak Tumbuhan Melastomataceae terhadap Bakteri Escherichia coli dan Staphylococcus aureus. Farmaka 16(2):69–77. https://doi.org/10.24198/jf.v16i2.17624

Hossain, T. J. 2024. Methods for screening and evaluation of antimicrobial activity: A review of protocols, advantages, and limitations. European Journal of Microbiology and Immunology 14(2):97–115. https://doi.org/10.1556/1886.2024.00035

Ichsani, A., C. F. Lubis, L. M. Urbaningrum, N. D. Rahmawati, and S. Anggraini. 2021. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid pada Tanaman. Jurnal Health Sains 2(6):751–757. https://doi.org/10.46799/jhs.v2i6.188

Khofifah, N., Y. P. Rahayu, H. M. Nasution, and D. Miswanda. 2025. Determination of minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of papaya leaf extract (Carica papaya L.) and its nanoparticles against Cutibacterium acnes bacteria. Journal of Pharmaceutical and Sciences 8(1):51–66. https://doi.org/10.36490/journal-jps.com.v8i1.720

Kowalska-Krochmal, B., and R. Dudek-Wicher. 2021. The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. Pathogens 10(2):165. https://doi.org/10.3390/pathogens10020165

Lagha, A. Ben, P. M. Huacho, and D. Grenier. 2021. A cocoa (Theobroma cacao L.) extract impairs the growth, virulence properties, and inflammatory potential of Fusobacterium nucleatum and improves oral epithelial barrier function. PLoS ONE 16(5):e0252029. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252029

Manalu, R. 2019. Pengelolaan Mutu Biji Kakao Petani Perkebunan Rakyat Melalui Teknologi Fermentasi Untuk Memperoleh Nilai Ekonomi Yang Lebih Baik. Jurnal Ekonomi dan Kebijakan Publik 9(2):99–112. https://doi.org/10.22212/jekp.v9i2.1006

Manongko, P. S., M. S. Sangi, and L. I. Momuat. 2020. Uji Senyawa Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Tanaman Patah Tulang (Euphorbia tirucalli L.). Jurnal MIPA 9(2):64–69. https://doi.org/10.35799/jmuo.9.2.2020.28725

Mardiah, A., and C. A. Nuraskin. 2022. Methanolic Extract From Cocoa Bean (Theobroma Cacao L.) As A Potential Active Ingredient In Mouthwash. Science Midwifery 10(3):2196–2205. https://doi.org/10.35335/midwifery.v10i3.638

Mulyatni, A. S., A. Budiani, and D. Taniwiryono. 2016. Aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah kakao (Theobroma cacao L.) terhadap Escherichia coli, Bacillus subtilis, dan Staphylococcus aureus. E-Journal Menara Perkebunan 80(2):77–84.

https://doi.org/10.22302/ppbbi.jur.mp.v80i2.39

Nikolic, P., and P. Mudgil. 2023. The Cell Wall, Cell Membrane and Virulence Factors of Staphylococcus aureus and Their Role in Antibiotic Resistance. microorganisms 11(2):259. https://doi.org/10.3390/microorganisms11020259

Ningsih, D. S., H. Henri, O. Roanisca, and R. G. Mahardika. 2020. Skrining Fitokimia dan Penetapan Kandungan Total Fenolik Ekstrak Daun Tumbuhan Sapu-Sapu (Baeckea frutescens L.). Biotropika: Journal of Tropical Biology 8(3):178–185. https://doi.org/10.21776/ub.biotropika.2020.008.03.06

Priamsari, M. R., and A. Rokhana. 2020. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanolik Daun Mengkudu (Morinda Citrifolia L.) Terhadap Bakteri Streptococcus Pyogenes secara In Vitro. Jurnal Farmasi (Journal of Pharmacy) 9(2):15–20.

Rahayu, Y. C., E. M. Setiawatie, R. P. Rahayu, and D. E. Ramadan. 2023. Analysis of antioxidant and antibacterial activity of cocoa pod husk extract (Theobroma cacao L.). Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi) 56(4):220–225. https://doi.org/10.20473/j.djmkg.v56.i4.p220-225

Ramayani, S. L., E. A. Permatasari, I. Novitasari, and M. Maryana. 2021. Pengaruh Metode Esktraksi Terhadap Kadar Total Fenolik, Kadar Total Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Mengkudu (Morinda citrifolia L.). Jurnal Ilmu Farmasi dan Farmasi Klinik 18(1):40–46.

Sánchez, M., T. Bernal, A. Laca, A. Laca, and M. Díaz. 2024. Hydrothermal Hydrolysis of Cocoa Bean Shell to Obtain Bioactive Compounds. Processes 12(5):956. https://doi.org/10.3390/pr12050956

Sastrawan, I. G. G., N. N. D. Fatmawati, N. N. S. Budayanti, and A. E. Darwinata. 2020. Uji Daya Hambar Ekstrak Etanol 96% Daun Gamal (Gliricidia sepium) terhadap Bakteri Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) ATCC 3351. Jurnal Medika Udayana 9(7):1–6.

Smułek, W., and E. Kaczorek. 2022. Factors Influencing the Bioavailability of Organic Molecules to Bacterial Cells—A Mini-Review. Molecules 27(19):6579. https://doi.org/10.3390/molecules27196579

Sony, S., Y. P. Rahayu, H. M. Nasution, and Z. Rani. 2025. Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Killing Concentration of the Extract and Nanoparticles of Pometia pinnata Leaf Extract Against Staphyloccocus aureus and Escherichia coli. Journal of Pharmaceutical and Sciences 8(2):1047–1065. https://doi.org/10.36490/journal-jps.com.v8i2.885

Tjandra, R. F., F. Fatimawali, and O. S. Datu. 2020. Analisis Senyawa Alkaloid dan Uji Daya Hambat Ekstrak Buah Sirih (Piper betle L) terhadap Bakteri Staphylococcus epidermidis. eBiomedik 8(2):173–179. https://doi.org/10.35790/ebm.v8i2.28963

Wowor, M. G. G., J. Tampara, E. Suryanto, and L. I. Momuat. 2022. Skrining Fitokimia dan Uji Antibakteri Masker Peel-Off Ekstrak Etanol Daun Kalu Burung (Barleria prionitis L.). Jurnal Ilmiah Sains 22(1):75–86. https://doi.org/10.35799/jis.v22i1.38954

Zhang, N., M. Wang, Y. Li, M. Zhou, T. Wu, and Z. Cheng. 2021. TLC–MS identification of alkaloids in Leonuri Herba and Leonuri Fructus aided by a newly developed universal derivatisation reagent optimised by the response surface method. Phytochemical Analysis 32(3):242–251. https://doi.org/10.1002/pca.2970

Zhou, J., Y. Cai, Y. Liu, H. An, K. Deng, M. A. Ashraf, L. Zou, and J. Wang. 2022. Breaking down the cell wall: Still an attractive antibacterial strategy. Frontiers in Microbiology 13:952633. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.952633