

AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK DAN FRAKSI N-HEKSANA KULIT BUAH KAKAO (*Theobroma cacao* L.)

**Agnia Purnama^{1*}, Binawati Ginting¹, Mustanir Yahya¹, Muhammad Ridho Afifi¹,
Ruhul Maghfirah¹, Mutia Farida¹, Hamdiyati¹**

¹Program Studi Kimia, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh, Indonesia

*Email: agniapurnama@usk.ac.id

Article History:

Received: April 28, 2025

Revised: May 26, 2025

Accepted: May 29, 2025

Published: June 3, 2025

DOI: <http://dx.doi.org/10.22373/lj.v13i1.29989>

ABSTRACT

This study aims to evaluate the antibacterial activity of the n-hexane extract and fraction of cocoa pod husk against Staphylococcus aureus. The antibacterial was tested using the paper disc diffusion method. The results showed that the extract inhibited bacteria with inhibition zones of 7.13 ± 0.29 ; 8.58 ± 0.14 ; 9.60 ± 0.87 ; and 10.97 ± 0.08 mm at concentrations of 1%, 5%, 10%, and 20%, respectively. The fractionation process produced 9 fractions and the 9th fraction showed the greatest inhibitory activity with inhibition zone diameters of 7.42 ± 0.03 ; 9.22 ± 0.03 ; 10.43 ± 0.03 ; and 11.83 ± 0.03 mm at concentrations of 1%; 5%; 10%; and 20% respectively. Phytochemical analysis and thin-layer chromatography (TLC) showed the presence of terpenoid and steroid compounds. Based on the antibacterial activity exhibited by the extract and fraction, this plant shows potential to be developed as a source of natural antibacterials.

Keywords: antibacterial, cacao pod husk, Staphylococcus aureus, Theobroma cacao L.

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu negara yang memiliki keragaman jenis tanaman dan sebagian besar dari tanaman ini berpotensi sebagai tanaman obat. Indonesia memiliki 80% dari spesimen tanaman seluruh dunia dengan kisaran jenis tanaman 25.000 hingga 30.000 dan menjadikan Indonesia sebagai negara kedua dengan keragaman biodiversitas setelah Brazil (Syamsiah *et al.*, 2016). Pemanfaatan tanaman obat di Indonesia terus berkembang seiring meningkatnya resistensi terhadap antibiotik sintesis, yang kini menjadi ancaman global. Resistensi antimikroba menyebabkan pengobatan kurang efektif, memperpanjang durasi pengobatan, bahkan dapat menyebabkan kematian (Siahaan *et al.*, 2022). Pada tahun 2019, 4,95 juta orang meninggal akibat terinfeksi bakteri yang resisten terhadap antibiotik (Gach *et al.*,

2024). Salah satu bakteri yang paling umum menyebabkan berbagai infeksi adalah *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) yang merupakan patogen penyebab infeksi kulit, jaringan, hingga organ tubuh seperti nasofaring (Wei *et al.*, 2023). Saat ini pengobatan penyakit yang disebabkan oleh bakteri ini masih menggunakan antibiotik, namun penggunaan antibiotik yang terus berulang menyebabkan peningkatan resisten terhadap bakteri *S. aureus*. Resistensi ini mendorong pencarian agen antimikroba baru yang lebih aman dan berbasis alam

Berbagai tanaman telah dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri yang signifikan. Tanaman yang berasal dari famili Malvaceae seperti *Hibiscus sabdariffa* dan *Abelmoschus esculentus* menunjukkan aktivitas antibakteri melalui kandungan metabolit sekundernya (Elkhalifa *et al.*, 2021; Venkatesan *et al.*, 2024). Aktivitas yang dihasilkan tanaman dalam famili Malvaceae memperkuat temuan bahwa tanaman *Theobroma cacao* L. juga memiliki aktivitas antibakteri. Penelitian sebelumnya melaporkan biji kakao yang mengandung epikatekin mampu mengurangi pertumbuhan *Porphyromonas gingivalis* hingga 84% dalam konsentrasi 1.000 µg/mL, dan menghambat pertumbuhan secara menyeluruh dalam konsentrasi 2.000 µg/mL (Vaillancourt *et al.*, 2022). Selain itu, ekstrak daun kakao mengandung metabolit sekunder seperti polifenol, tanin, terpenoid, dan steroid yang berfungsi dalam menghambat pertumbuhan patogen *Enterobacter aerogenes* dengan nilai Konsentrasi Bakterisida Minimum (MBC) sebesar 256 µg/mL (Nayim *et al.*, 2018).

Bagian lain dari tanaman kakao yang potensinya belum banyak dimanfaatkan dan sering menjadi limbah pertanian adalah kulit buah kakao. Kulit buah kakao merupakan komponen terbesar dari massa buah kakao. Ekstraksi dengan berbagai pelarut menunjukkan bahwa pelarut *n*-heksana memberikan rendemen tertinggi jika dibandingkan dengan pelarut metanol dan etil asetat (Febrina *et al.*, 2024). Aktivitas antibakteri ekstrak metanol dan etil asetat telah dilaporkan pada penelitian sebelumnya, terbukti mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* pada konsentrasi 20% dan 10% secara berturut-turut (Yahya *et al.*, 2021). Sementara itu, fraksinasi menggunakan pelarut polar menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus epidermidis* dan *Salmonella choleraesuis* (Santos *et al.*, 2014). Hingga saat ini, aktivitas antibakteri dari ekstrak *n*-heksana serta fraksinya belum banyak dilaporkan. Analisis aktivitas sitotoksik dalam penelitian kami sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak serta fraksi kulit buah kakao *n*-heksana mengandung terpenoid eukaliptol sebesar 22,93% dan memiliki aktivitas sitotoksik tinggi dengan nilai IC₅₀ 192,75 ppm untuk ekstrak dan 0,29 ppm untuk fraksi yang paling aktif (Mustanir *et al.*, 2020). Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk

menganalisis aktivitas antibakteri dari ekstrak *n*-heksana serta fraksi-fraksinya terhadap *S. aureus* dalam upaya eksplorasi bioaktivitas dari limbah pertanian.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Peralatan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah metanol teknis, *n*-heksana teknis, etil asetat teknis, Nutrient Agar (NA) (Oxoid, England), Mueller-Hinton Agar (MHA) (Oxoid, England), Dragendorff (Sigma-Aldrich), Mayer (Sigma-Aldrich), Liebermann–Burchard (Merck, Germany), larutan FeCl₃ 1% (Merck, Germany), larutan HCl 1 N (Merck, Germany), serbuk Mg (Merck, Germany), larutan amonia 25% (Merck, Germany), air suling, larutan NaCl 0,9% steril (Merck, Germany), dan gentamisin 10 µg (Oxoid, England). Bakteri uji yang digunakan adalah *S. aureus* ATCC 25923.

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah autoklaf, inkubator suhu 37°C, spektrofotometer UV-Vis SHIMADZU® tipe UV-1800, rotary evaporator Rotavapor® R-300, dan kolom kromatografi (Pyrex).

Pengumpulan dan Identifikasi Tanaman

Kulit buah kakao diambil dan dikumpulkan dari Desa Lawe Loning, Kecamatan Lawe Sigala-gala, Kabupaten Aceh Tenggara, Provinsi Aceh. Pengambilan sampel dilakukan pada awal Februari 2019 dan dilanjutkan dengan identifikasi di Laboratorium Herbarium, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Syiah Kuala.

Ekstraksi Kulit Buah Kakao

Sampel kulit buah kakao dibersihkan dari kotoran yang menempel, kemudian dipotong menjadi ukuran yang lebih kecil, dikeringanginkan, dan digiling hingga sampel berbentuk serbuk (*simplisia*). Sebanyak 20 kg *simplisia* dimaserasi menggunakan pelarut metanol selama 24 jam pada suhu ruang. Hasil maserasi disaring dan bagian filtratnya diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* untuk mendapatkan ekstrak kental. Ekstrak kental tersebut selanjutnya dipartisi dengan *n*-heksana dan diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak *n*-heksana kulit buah kakao.

Isolasi Ekstrak *n*-Heksana Kulit Buah Kakao

Ekstrak *n*-heksana kulit buah kakao sebanyak 50 g dipisahkan menggunakan kromatografi kolom gravitasi dengan fase diam silika gel G₆₀ dan pelarut *n*-heksana:etil asetat sebagai eluen (1:0 hingga 0:1, v/v). Setiap eluat diidentifikasi pola noda menggunakan

kromatografi lapis tipis dengan eluen *n*-heksana:etil asetat. Eluat dengan pola noda yang sama digabungkan dan dijadikan satu fraksi.

Pengujian Fitokimia

Ekstrak *n*-heksana kulit buah kakao yang diperoleh dilakukan pengujian fitokimia yang meliputi pengujian kandungan alkaloid, steroid, terpenoid, flavonoid, saponin, dan fenolik berdasarkan prosedur Harborne (Harborne, 1984).

Pengujian aktivitas antibakteri

Pembuatan Konsentrasi Larutan Uji

Sebanyak 0,02 gram dari ekstrak *n*-heksana kulit buah kakao dilarutkan dalam 1 mL *n*-heksana untuk memperoleh larutan uji 20% (b/v). Larutan uji tersebut dijadikan stok untuk membuat larutan dengan konsentrasi 1%, 5%, 10%, dan 20%.

Pembuatan dan Sterilisasi Media

Penelitian ini menggunakan media *Nutrient Agar* (NA) sebagai media pertumbuhan bakteri dan *Mueller-Hinton Agar* (MHA) sebagai media uji aktivitas antibakteri. Pembuatan media NA dilakukan dengan cara melarutkan 0,84 gram bubuk NA ke dalam 30 mL akuades. Sedangkan Media MHA dibuat dengan melarutkan 44,46 g bubuk MHA ke dalam 1.170 mL akuades. Kedua media tersebut masing-masing diaduk sampai homogen dalam erlenmeyer dan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi selesai, suhu media dibiarkan menurun hingga mencapai ± 50 °C. Media dituangkan ke dalam cawan petri dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam.

Kultur Bakteri

Stok bakteri *S. aureus* diinokulasikan pada media NA dengan metode tiga kuadran. Pinggiran cawan petri dipanaskan dan dibalut menggunakan plastik *wrap*. Kemudian, media diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18 jam.

Pembuatan Suspensi Bakteri

Diambil 3-5 koloni, bakteri *S. aureus* yang telah dikultur, menggunakan ose yang telah dipijarkan dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan NaCl 0,9% steril. Campuran tersebut dihomogenkan dan diukur kerapatannya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 625 nm dengan nilai absorbansi 0,08-0,10 sesuai dengan kerapatan

standar 0,5 *McFarland* atau setara dengan $1-2 \times 10^8$ *Colony Forming Unit* (CFU)/mL. Suspensi inokulum yang sesuai dengan standar digunakan untuk pengujian aktivitas antibakteri.

Uji Daya Hambat Ekstrak dan Fraksi n-Heksana Terhadap Pertumbuhan Bakteri

Aktivitas antibakteri dianalisis menggunakan metode difusi kertas cakram (Kirby-Bauer) dengan modifikasi (Hudzicki, 2009). Inokulum diswab ke seluruh permukaan media MHA, diulangi sebanyak tiga kali dengan memutar media sebesar 60° pada setiap pengulangan. Cakram yang ditetesi masing-masing pelarut (sebagai kontrol negatif), larutan uji sebanyak 20 µL (1%, 5%, 10%, dan 20%) dan gentamisin (sebagai kontrol positif) dimasukkan ke media. Pertumbuhan bakteri diamati pada setiap cakram. Zona hambat atau zona bening diukur menggunakan jangka sorong dalam ukuran milimeter.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Fitokimia Ekstrak *n*-heksana Kulit Buah Kakao

Uji fitokimia merupakan analisis kualitatif pada tanaman yang bertujuan untuk mengetahui keberadaan golongan senyawa metabolit sekunder terkandung sehingga dapat dijadikan panduan dalam isolasi senyawa dan uji hayati. Berdasarkan hasil uji fitokimia (**Tabel 1**), ekstrak *n*-heksana kulit buah kakao mengandung senyawa golongan terpenoid dan steroid. Penelitian kami sebelumnya menunjukkan bahwa hasil analisis fraksi *n*-heksana kulit buah kakao yang aktif mengandung tiga jenis senyawa monoterpenoid yaitu eucalyptol, eugenol, dan d-limonene yang merupakan senyawa nonpolar (Mustanir *et al.*, 2020). Isolasi senyawa steroid dalam ekstrak *n*-heksana kulit buah kakao belum pernah dilaporkan secara kuantitatif, namun analisis kualitatif pada ekstrak ini terbukti mengandung senyawa steroid dan terpenoid (Yahya *et al.*, 2021). Pelarut nonpolar seperti *n*-heksana efektif untuk mengekstrak senyawa-senyawa nonpolar, termasuk terpenoid dan steroid dengan polaritas rendah seperti diterpenoid dan sterol (Siddiqui *et al.*, 2024). Analisis komponen senyawa dari ekstrak nonpolar *Arctium lappa* L. Root memperoleh 14 senyawa nonpolar, di antaranya adalah 4 terpenoid, 2 sterol dan 1 turunan steroid (Romano *et al.*, 2025).

Tabel 1. Uji fitokimia ekstrak *n*-heksana kulit buah kakao

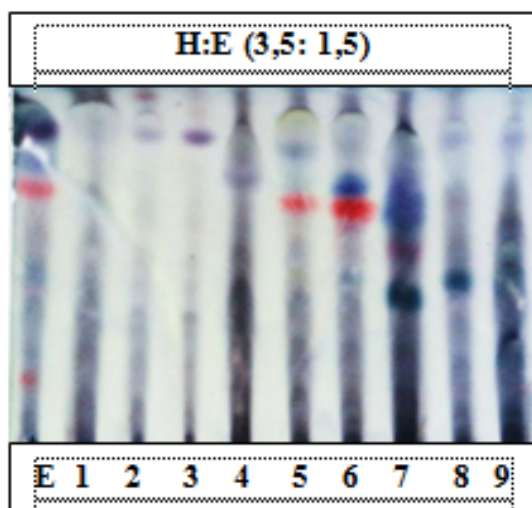
Uji Fitokimia	Reagen Uji	Ekstrak <i>n</i> -Heksana Kulit Buah Kakao
Alkaloid	Mayer	-
	Wagner	-
	Dragendorff	-

Flavonoid	Mg + HCl 1 N	-
Terpenoid	Liebermann-Burchard	+
Steroid	Liebermann-Burchard	+
Saponin	H ₂ O dan dikocok	-
Fenolik	FeCl ₃ 1%	-

Keterangan: + : Mengandung senyawa metabolit sekunder
 - : Tidak mengandung senyawa metabolit sekunder

Isolasi Komponen Kimia Ekstrak *n*-Heksana Kulit Buah Kakao

Hasil pemisahan komponen kimia dari ekstrak *n*-heksana kulit buah kakao menggunakan kromatografi kolom diperoleh 450 fraksi, kemudian dianalisis menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) untuk mengamati pola noda tiap fraksi. Pola noda setiap fraksi yang memiliki pola noda yang sama digabungkan hingga mendapatkan total fraksi akhir menjadi 9 fraksi (Gambar 1).

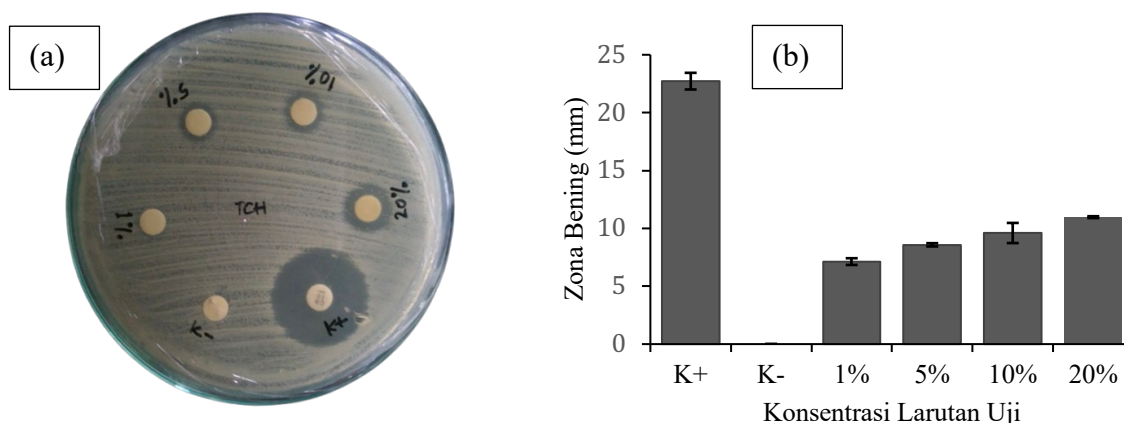


Gambar 1. Pola Noda KLT Ekstrak *n*-Heksana Kulit Buah Kakao (E) dan Sembilan Fraksi Gabungan (1–9) dengan Eluen *N*-Heksana:Etil Asetat (3,5:1,5) v/v

Hasil KLT menunjukkan bahwa fraksi gabungan 1-9 mengandung senyawa terpenoid atau steroid yang ditandai dengan pola noda berwarna merah-ungu (Satria *et al.*, 2023). Hasil penentuan kualitatif senyawa metabolit sekunder menggunakan plat KLT pada fraksi menunjukkan kesesuaian dengan hasil uji fitokimia terhadap ekstrak. Fraksi 7, 8, dan 9 menunjukkan pola noda lebih rendah yang mengindikasikan kemungkinan adanya senyawa terpenoid atau steroid dengan gugus polar seperti hidroksil (Jiang *et al.*, 2016). Fraksinasi pada ekstrak dengan pelarut polar, yaitu metanol, juga sudah dilaporkan dan didapatkan 9 fraksi gabungan dengan senyawa utama berupa asam benzoat polar (Yahya *et al.*, 2022).

Aktivitas Antibakteri Ekstrak dan Fraksi *n*-Heksana Kulit Buah Kakao

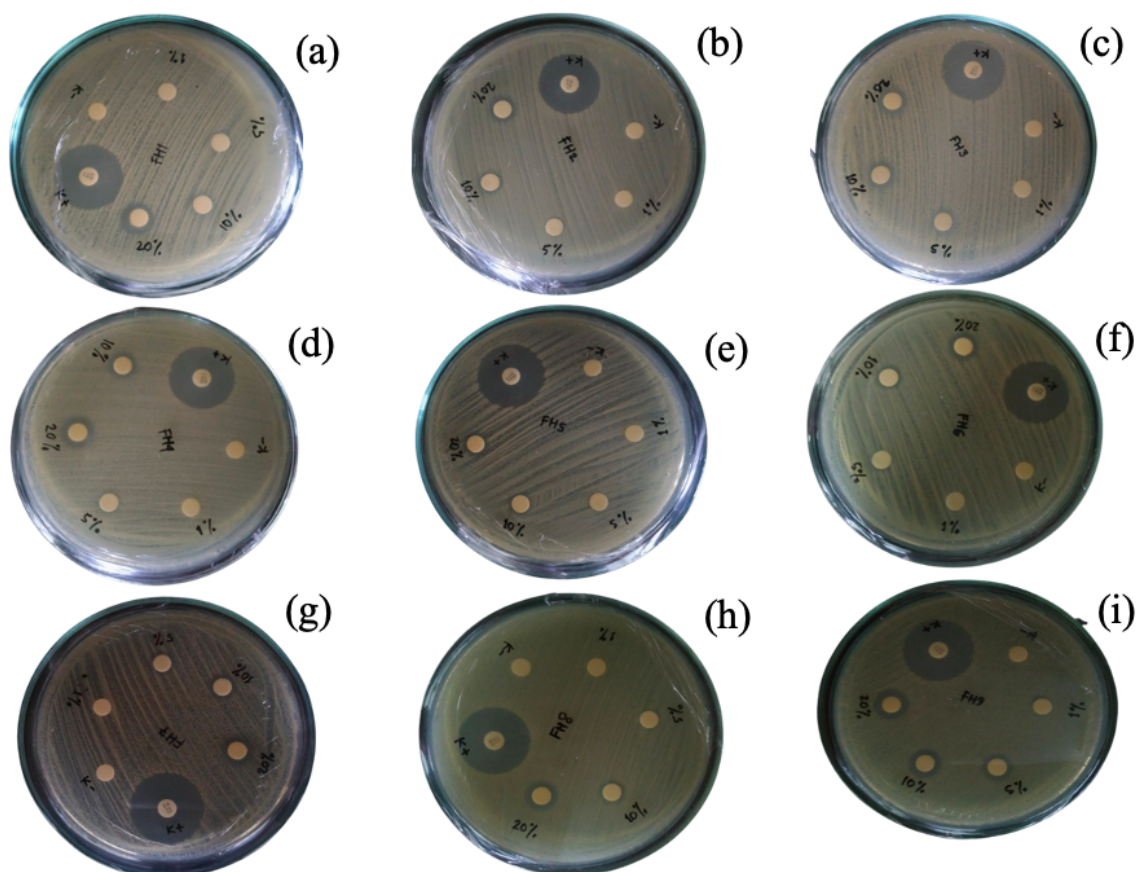
Aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi *n*-heksana kulit buah kakao dianalisis menggunakan metode difusi kertas cakram (Kirby Bauer). Zona bening yang dihasilkan oleh ekstrak dan fraksi menentukan aktivitas antibakteri yang dihasilkan. Semakin luas dan jelas zona bening tersebut, semakin aktif senyawa sebagai antibakteri (Koohsari *et al.*, 2015). Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi *n*-heksana kulit buah kakao terhadap bakteri *S. aureus* dinyatakan dalam ukuran milimeter yang ditampilkan pada Gambar 2 dan Gambar 3.

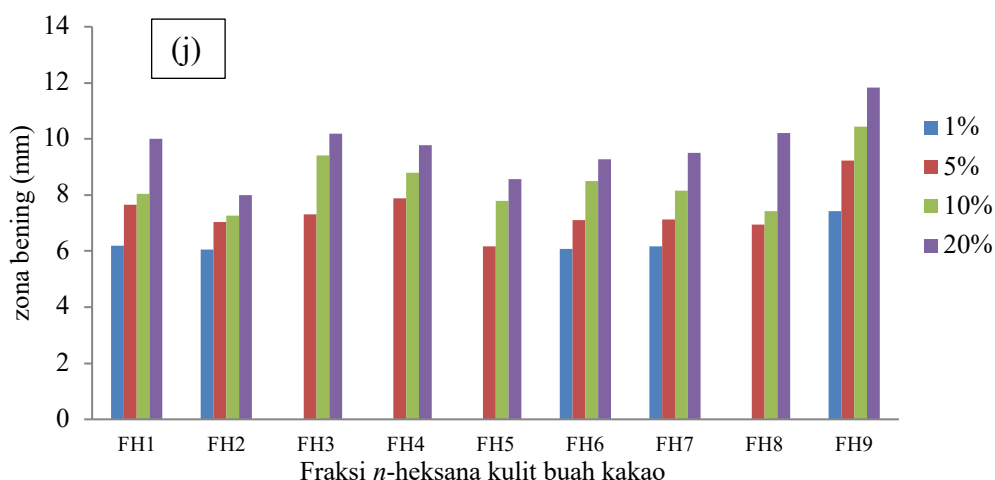


Gambar 2. Aktivitas antibakteri ekstrak *n*-heksana kulit buah kakao (a) Zona hambat yang dihasilkan pada uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi cakram. K+ = kontrol positif (gentamisin), K- = kontrol negatif (pelarut), angka persen menunjukkan konsentrasi ekstrak (1%, 5%, 10%, 20%); (b) Diameter zona bening (mm) pada berbagai konsentrasi ekstrak. Data disajikan sebagai rerata $\pm$ standar deviasi ($n = 3$).

Ekstrak *n*-heksana kulit buah kakao dengan konsentrasi 1%, 5%, 10%, dan 20% menghasilkan diameter zona hambat berturut-turut yaitu $7,13 \pm 0,29$ mm; $8,58 \pm 0,14$ mm; $9,60 \pm 0,87$ mm dan $10,97 \pm 0,08$ mm. Aktivitas antibakteri semakin meningkat dengan bertambahnya konsentrasi ekstrak. Berdasarkan zona hambat yang dihasilkan, ekstrak *n*-heksana kulit buah kakao dengan konsentrasi di bawah 10% digolongkan sebagai ekstrak yang memiliki kekuatan antibakteri pada tingkat sedang dengan zona hambar diantara 5-10 mm (Indriani *et al.*, 2020). Dalam penelitian ini, dapat dilihat bahwa kontrol positif yang digunakan (gentamisin) menunjukkan daya antibakteri yang sangat kuat dengan zona hambat yang dihasilkan sebesar > 20 mm. Ekstrak masih dikategorikan sebagai antibakteri sedang diduga karena konsentrasi senyawa aktif yang rendah akibat masih sangat banyak senyawa lain yang bercampur sehingga mengganggu aktivitas masing-masing senyawa, terutama senyawa yang

berperan sebagai antibakteri. Aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah kakao terhadap *S. aureus* dengan pelarut etil asetat juga telah dilaporkan, menunjukkan aktivitas tertinggi pada konsentrasi 20% (Yahya *et al.*, 2021). Sementara itu, ekstrak metanolnya memiliki nilai MIC sebesar 0,62 mg/mL, yang dikategorikan efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri (Indrianingsih *et al.*, 2021). Pektin dari kulit buah kakao juga terbukti mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus* dengan nilai MIC 0.5–1.0 mg/mL (Adi-Dako *et al.*, 2016).





Gambar 3. Aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana kulit buah kakao (a–i): Zona hambat yang dihasilkan pada uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi cakram untuk masing-masing fraksi (FH1–FH9). K+ = kontrol positif (gentamisin), K– = kontrol negatif (pelarut), angka persen menunjukkan konsentrasi fraksi (1%, 5%, 10%, 20%); (j) Diameter zona bening (mm) dari masing-masing fraksi pada berbagai konsentrasi. Data disajikan sebagai rerata $\pm$ standar deviasi ($n = 3$).

Hubungan antara konsentrasi fraksi 1-9 terhadap diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* menunjukkan hubungan linear antara konsentrasi dengan diameter zona hambat. Fraksi 1, 2, 6, 7, dan 9 memiliki aktivitas antibakteri mulai dari konsentrasi 1%. Sedangkan fraksi 3, 4, 5, dan 8 mulai mampu menghambat pertumbuhan bakteri pada konsentrasi 5%. Hal ini diduga karena tingginya kandungan senyawa aktif antibakteri, khususnya senyawa lipofilik pada fraksi 1, 2, 6, 7, dan 9, sedangkan fraksi lainnya memiliki kadar yang lebih sedikit atau adanya senyawa yang aktivitasnya kurang efektif pada konsentrasi rendah. Senyawa lipofilik seperti terpenoid diketahui mampu merusak membran sel bakteri hingga menyebabkan kematian sel (Nasir Shah *et al.*, 2023). Dari kesembilan fraksi ini, fraksi 9 memiliki zona hambat yang paling tinggi. Fraksi 9 terbukti mengandung senyawa terpenoid/steroid yang mengindikasikan kemungkinan golongan senyawa ini berpotensi sebagai antibakteri. Beberapa senyawa terpenoid seperti simena, limonena, sitronelol, linalool dan eugenol terbukti memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* (Guimaraes *et al.*, 2019). Senyawa steroid pregnadiene-11-hydroxy-16 α ,17 α -epoxy-3,20-dione-1 juga terbukti memiliki aktivitas antibakteri (Vollaro *et al.*, 2020). Berdasarkan penelitian kami sebelumnya yang menganalisis komponen kimia fraksi *n*-heksana kulit buah kakao, terpenoid eukaliptol, Lantanida Journal, 13(1): 72-84

eugenol, dan D-limonen merupakan senyawa yang aktif yang terkandung dalam fraksi (Mustanir *et al.*, 2020). Ketiga senyawa ini telah terbukti memiliki aktivitas antibakteri terhadap berbagai strain bakteri (Han *et al.*, 2019; Hoch *et al.*, 2023; Marchese *et al.*, 2017).

KESIMPULAN

Ekstrak dan fraksi *n*-heksana kulit buah kakao mengandung senyawa bioaktif steroid dan terpenoid yang berkontribusi terhadap aktivitas antibakterinya. Analisis ekstrak menunjukkan kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dengan kategori sedang pada konsentrasi 20%. Di antara sembilan fraksi yang diperoleh, fraksi ke-9 merupakan fraksi yang paling aktif dengan efektivitas antibakteri sedang pada konsentrasi 1%. Berdasarkan temuan pada penelitian ini, kulit buah kakao berpotensi untuk dikembangkan menjadi sumber antibakteri alami. Untuk mendukung pemanfaatannya, isolasi senyawa aktif murni diperlukan untuk mengidentifikasi secara spesifik senyawa aktif yang berkontribusi dalam aktivitas antibakteri tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Adi-Dako, O., Ofori-Kwakye, K., Frimpong Manso, S., Boakye-Gyasi, M. E., Sasu, C., & Pobee, M. (2016). Physicochemical and Antimicrobial Properties of Cocoa Pod Husk Pectin Intended as a Versatile Pharmaceutical Excipient and Nutraceutical. *J Pharm (Cairo)*, 2016, 7608693. <https://doi.org/10.1155/2016/7608693>
- Elkhalifa, A. E. O., Alshammari, E., Adnan, M., Alcantara, J. C., Awadelkareem, A. M., Eltoum, N. E., Mehmood, K., Panda, B. P., & Ashraf, S. A. (2021). Okra (*Abelmoschus Esculentus*) as a Potential Dietary Medicine with Nutraceutical Importance for Sustainable Health Applications. *Molecules*, 26(3). <https://doi.org/10.3390/molecules26030696>
- Febrina, R. V., Yahya, M., & Windananti, S. (2024). Toxicity of methanolic extract from cocoa pod husk (*Theobroma cacao* L) using brine shrimp lethality test (BSLT). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1356(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1356/1/012110>
- Gach, M. W., Lazarus, G., Simadibrata, D. M., Sinto, R., Saharman, Y. R., Limato, R., Nelwan, E. J., van Doorn, H. R., Karuniawati, A., & Hamers, R. L. (2024). Antimicrobial resistance among common bacterial pathogens in Indonesia: a systematic review. *Lancet Reg Health Southeast Asia*, 26, 100414. <https://doi.org/10.1016/j.lansea.2024.100414>
- Guimaraes, A. C., Meireles, L. M., Lemos, M. F., Guimaraes, M. C. C., Endringer, D. C., Fronza, M., & Scherer, R. (2019). Antibacterial Activity of Terpenes and Terpenoids

- Present in Essential Oils. *Molecules*, 24(13).
<https://doi.org/10.3390/molecules24132471>
- Han, Y., Sun, Z., & Chen, W. (2019). Antimicrobial Susceptibility and Antibacterial Mechanism of Limonene against *Listeria monocytogenes*. *Molecules*, 25(1).
<https://doi.org/10.3390/molecules25010033>
- Harborne, J. B. (1984). *Phytochemical Methods*. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-5570-7>
- Hoch, C. C., Petry, J., Griesbaum, L., Weiser, T., Werner, K., Ploch, M., Verschoor, A., Multhoff, G., Bashiri Dezfouli, A., & Wollenberg, B. (2023). 1,8-cineole (eucalyptol): A versatile phytochemical with therapeutic applications across multiple diseases. *Biomed Pharmacother*, 167, 115467. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115467>
- Hudzicki, J. (2009). Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. *American society for microbiology*, 15(1), 1-23.
- Indriani, V., Chiuman, L., Wijaya, L. L., Lister, G., & Grandis, L. (2020). Antibacterial Effect of Curcuma zedoaria Extract on *Bacillus cereus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Althea Medical Journal*, 7(1), 6-10. <https://doi.org/10.15850/amj.v7n1.1886>
- Indrianingsih, A. W., Wulanjati, M. P., Windarsih, A., Bhattacharjya, D. K., Suzuki, T., & Katayama, T. (2021). In vitro studies of antioxidant, antidiabetic, and antibacterial activities of *Theobroma cacao*, *Annona muricata* and *Clitoria ternatea*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 33. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.101995>
- Jiang, Z., Kempinski, C., & Chappell, J. (2016). Extraction and Analysis of Terpenes/Terpenoids. *Curr Protoc Plant Biol*, 1, 345-358.
<https://doi.org/10.1002/cppb.20024>
- Koohsari, H., Ghaemi, E. A., Sadegh Sheshpoli, M., Jahedi, M., & Zahiri, M. (2015). The investigation of antibacterial activity of selected native plants from North of Iran. *J Med Life*, 8(Spec Iss 2), 38-42.
- Marchese, A., Barbieri, R., Coppo, E., Orhan, I. E., Daglia, M., Nabavi, S. F., Izadi, M., Abdollahi, M., Nabavi, S. M., & Ajami, M. (2017). Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. *Crit Rev Microbiol*, 43(6), 668-689. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1295225>
- Mustanir, Nurdin, Ginting, B., & Purnama, A. (2020). Chemical composition and cytotoxic activities of n-Hexane extract from cacao pod husk (*Theobroma cacao* L.). *Chemical Data Collections*, 30. <https://doi.org/10.1016/j.cdc.2020.100553>
- Nasir Shah, S., Khan, I., Tul Muntaha, S., Hayat, A., Ur Rehman, M., Ali Shah, T., Siddique, F., Salamatullah, A. M., Mekonnen, A. B., & Bourhia, M. (2023). Bioactive, antioxidant and antimicrobial properties of chemically fingerprinted essential oils extracted from

- Eucalyptus globulus: in-vitro and in-silico investigations. *Front Chem*, 11, 1287317. <https://doi.org/10.3389/fchem.2023.1287317>
- Nayim, P., Mbaveng, A. T., Wamba, B. E. N., Fankam, A. G., Dzotam, J. K., & Kuete, V. (2018). Antibacterial and Antibiotic-Potentiating Activities of Thirteen Cameroonian Edible Plants against Gram-Negative Resistant Phenotypes. *ScientificWorldJournal*, 2018, 4020294. <https://doi.org/10.1155/2018/4020294>
- Romano, E., Domínguez-Rodríguez, G., Mannina, L., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2025). Characterization of Non-Polar and Polar Bioactive Compounds Obtained by Pressurized Biobased Solvents from Different *Arctium lappa* L. Root Ecotypes. *Applied Sciences*, 15(5). <https://doi.org/10.3390/app15052491>
- Santos, R. X., Oliveira, D. A., Sodre, G. A., Gosmann, G., Brendel, M., & Pungartnik, C. (2014). Antimicrobial activity of fermented *Theobroma cacao* pod husk extract. *Genet Mol Res*, 13(3), 7725-7735. <https://doi.org/10.4238/2014.September.26.10>
- Satria, D., Dalimunthe, A., Pertiwi, D., Muhammad, M., Kaban, V. E., Nasri, N., & Waruwu, S. B. (2023). Phytochemicals, proximate composition, minerals and volatile oil analysis of *Zanthoxylum acanthopodium* DC. fruits. *F1000Research*, 12. <https://doi.org/10.12688/f1000research.128941.1>
- Siahaan, S., Herman, M. J., & Fitri, N. (2022). Antimicrobial Resistance Situation in Indonesia: A Challenge of Multisector and Global Coordination. *J Trop Med*, 2022, 2783300. <https://doi.org/10.1155/2022/2783300>
- Siddiqui, T., Khan, M. U., Sharma, V., & Gupta, K. (2024). Terpenoids in essential oils: Chemistry, classification, and potential impact on human health and industry. *Phytomedicine Plus*, 4(2). <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2024.100549>
- Syamsiah, S., Hiola, S. F., Mu'nisa, A., & Jumadi, O. (2016). Study on Medicinal Plants Used by the Ethnic Mamuju in West Sulawesi, Indonesia. *Journal of Tropical Crop Science*, 3(2), 43-48. <https://doi.org/10.29244/jtcs.3.2.43-48>
- Vaillancourt, K., Ben Lagha, A., & Grenier, D. (2022). A Phenolic-rich Extract of Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Beans Impairs the Pathogenic Properties of *Porphyromonas gingivalis* and Attenuates the Activation of Nuclear Factor Kappa B in a Monocyte Model. *Front Oral Health*, 3, 867793. <https://doi.org/10.3389/froh.2022.867793>
- Venkatesan, K., Venkatesan, S., & Manivannan, N. (2024). Antibacterial Activity of *Hibiscus sabdariffa* (Rosella) Using Methanolic Extract. *J Pharm Bioallied Sci*, 16(Suppl 2), S1191-S1194. https://doi.org/10.4103/jpbs.jpbs_527_23
- Vollaro, A., Esposito, A., Esposito, E. P., Zarrilli, R., Guaragna, A., & De Gregorio, E. (2020). PYED-1 Inhibits Biofilm Formation and Disrupts the Preformed Biofilm of

- Staphylococcus aureus. *Antibiotics* (Basel), 9(5).
<https://doi.org/10.3390/antibiotics9050240>
- Wei, C., Cui, P., & Liu, X. (2023). Antibacterial Activity and Mechanism of Madecassic Acid against Staphylococcus aureus. *Molecules*, 28(4).
<https://doi.org/10.3390/molecules28041895>
- Yahya, M., Ginting, B., & Saidi, N. (2021). In-Vitro Screenings for Biological and Antioxidant Activities of Water Extract from Theobroma cacao L. Pod Husk: Potential Utilization in Foods. *Molecules*, 26(22). <https://doi.org/10.3390/molecules26226915>
- Yahya, M., Ginting, B., & Saidi, N. (2022). Anticancer and antiretroviral activities of methanolic extract from Theobroma cacao L pod husk: focusing on the ethyl acetate partition. *F1000Research*, 11. <https://doi.org/10.12688/f1000research.128048.1>