

NANO SPRAY DARI LIMBAH KULIT KAKAO SEBAGAI AGEN ANTI BAKTERI KLEBSIELLA PNEUMONIA

Ratih Lestari¹, Aditya Sewanggara Amatyawangsa Wicaksana², Kartika Puspitasari³, Yandi Syukri⁴

^{1,2}Prodi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia

^{3,4}Prodi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia
Yogyakarta

ABSTRAK

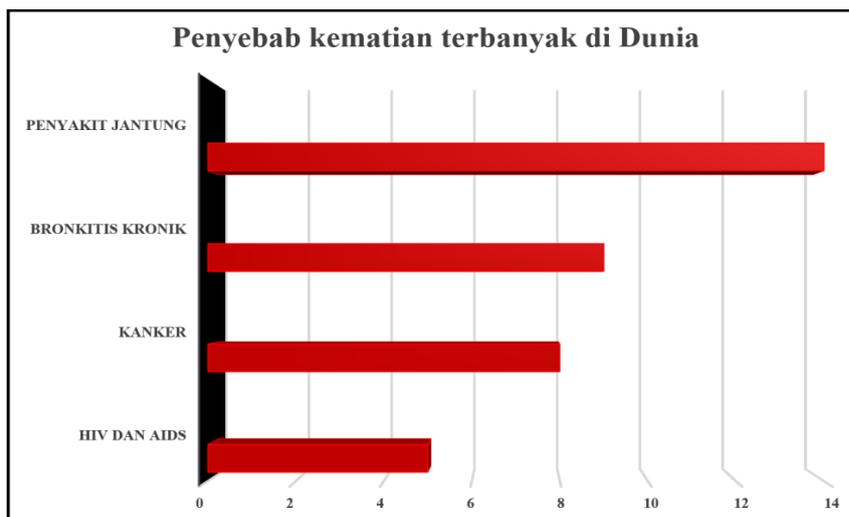
Indonesia merupakan negara ketiga dengan jumlah perokok terbesar (Afiati,2016). Asap rokok mengandung senyawa racun organo klorin yang dapat memicu pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae* yaitu salah satu bakteri penyebab bronkitis kronik (Ikawati,2011). Saat ini pengobatan untuk bronkitis kronik telah dilakukan dengan antibiotik, akan tetapi memiliki kekurangan yaitu alergi, iodosinkranasi dan dapat menyebabkan resistensi bakteri. Disisi lain, kulit kakao merupakan limbah utama dari pengolahan biji kakao untuk berbagai produk coklat. Diketahui bahwa terdapat senyawa flavonoid dari kulit buah kakao (Hu dan Li, 2011). Flavonoid merupakan senyawa yang diduga mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae* penyebab penyakit bronkitis (Kandou, 2016). Pada penelitian ini kami memanfaatkan limbah kulit kakao sebagai solusi pengobatan bronkitis kronik dengan menggunakan metode nanospray yang berbasis gelas ionik. Prinsip nano digunakan untuk memperkecil ukuran zat aktif sediaan obat sehingga lebih mudah diabsorpsi kedalam sel target. Metode isolasi flavonoid yang digunakan adalah maserasi serbuk kulit kakao dengan etanol 96% perbandingan 1:10 selama 24 jam. Isolat kemudian di saring dan pelarut pada filtrat diuapkan dengan rotary evaporator sehingga diperoleh ekstrak kental kulit kakao yang mengandung flavonoid. Pembuatan nanospray isolat kulit kakao yang mengandung flavonoid menggunakan metode gelas ionik dengan bahan NaTPP 0,1% b/v dan beberapa variasi konsentrasi kitosan yaitu 0,1%; 0,3%; 0,4% (b/v). Sediaan koloid yang diperoleh dengan ukuran paling kecil adalah menggunakan konsentrasi kitosan 0,1% dengan ukuran partikel 470,7 nm. Diharapkan dengan adanya pembuatan nanospray inhaler dari limbah kulit kakao ini menjadi langkah inovatif yang memberikan tiga keuntungan sekaligus yaitu (i) nilainya yang ekonomis (ii) sebagai solusi alternatif pengobatan penyakit bronkitis kronik yang tepat sasaran dan (iii) mampu mengatasi permasalahan lingkungan akibat limbah kulit kakao.

Kata kunci: Bronkitis, flavonoid, maserasi, *nanospray*

1. PENDAHULUAN

Dewasa ini ketergantungan manusia akibat rokok semakin meningkat. Menurut data WHO, jumlah perokok di dunia mencapai 1,2 miliar dan 800 juta di antaranya berada di negara berkembang. Pada tahun 2009, Indonesia merupakan negara ketiga dengan jumlah perokok terbesar di dunia setelah Cina dan India (Afiati, 2016). Merokok diperkirakan sebagai

salah satu penyebab kematian utama bagi umat manusia, diperkirakan sekitar 106.000 kematian setiap tahunnya dan lebih dari 2000 setiap minggunya. Dengan melihat tingginya angka kematian akibat rokok, WHO menggolongkan rokok sebagai salah satu penyebab kematian terbesar di Dunia setelah penyakit kanker (WHO, 2014).



Gambar 1. Data penyebab kematian terbanyak di Dunia (Aifin et al, 2006)

Asap rokok selain dapat membahayakan kesehatan perokok sendiri, juga dapat membahayakan lingkungannya, yaitu orang-orang yang berada disekitarnya. Menurut hasil penelitian, asap rokok mengandung senyawa racun organoklorin yang dapat memicu pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae*. *Klebsiella pneumoniae* merupakan salah satu bakteri yang menyebabkan bronkitis kronik (Depkes RI, 2009);(Ikawati, 2011). Bronkitis kronik merupakan salah satu penyakit infeksi saluran pernapasan bawah yang ditandai dengan kondisi peradangan pada daerah trakheobronkhia (DBFKK, 2005).

Pengobatan klinis untuk menangani penyakit bronkitis yaitu dengan penggunaan antibiotik. Efek samping penggunaan antibiotik tersebut dapat berupa reaksi alergi, reaksi idiosinkrasi, reaksi toksik, serta perubahan biologik dan metabolik pada hospes (Setiabudy,2007). Selain itu, solusi pengobatan konvensional dengan cara pemberian obat oral bagi penderita penyakit bronkitis tidak efisien karena obat yang dikonsumsi menjadi resisten terhadap bakteri kinerja obat menjadi tidak tepat sasaran, hal ini dikarenakan dalam proses interaksi antara obat dengan reseptor di dalam tubuh tidak optimal karena hanya sebagian dari obat yang berinteraksi dengan reseptor, sedangkan sebagian yang lain akan berinteraksi dengan protein-protein yang ada di dalam tubuh (Wadhwa et all, 2011).

Alternatif yang dapat dilakukan adalah dengan memanfaatkan senyawa yang terkandung dalam bahan alam untuk pengobatan bronkitis yang efektif dan efisien. Salah satu bahan alam yang berpotensi sebagai alternatif pengobatan bronkitis adalah kulit kakao. Kulit kakao merupakan limbah utama dari pengolahan biji kakao yaitu mencapai 70% dari keseluruhan buah, mengandung air sekitar 85%, serat kasar 27%, dan protein 8%, ada juga yang menyebutkan bahwa setiap ton biji kakao kering menghasilkan 10 ton kulit buah kakao [16,23](Purnama, 2004) ; (Tjitrosoepomo, 1998).

Penelitian sebelumnya, diketahui bahwa telah dilakukan isolasi terhadap senyawa flavonoid dari kulit buah kakao (Listyannisa, 2012) ; (Mulyatni et all, 2016). Flavonoid merupakan salah satu senyawa yang diduga mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Berdasarkan hasil penelitian Kandou (2016) menyebutkan bahwa ekstrak rimpang lengkuas merah yang mengandung flavonoid memberikan aktivitas antibakteri terhadap tikus yang diinfeksi bakteri *Klebsiella pneumoniae* penyebab penyakit bronkitis.

Pada penelitian ini kami memanfaatkan limbah kulit kakao yang menjadi permasalahan lingkungan di Indonesia sebagai solusi pengobatan penyakit bronkitis kronik dengan menggunakan metode nanospray yang berbasis lipid based formulation. Diharapkan dengan pembuatan sediaan nanospray dari limbah kulit kakao sebagai solusi pengobatan penyakit

bronkitis ini merupakan langkah inovatif yang memberikan tiga keuntungan sekaligus yaitu (i) nilainya yang ekonomis (ii) sebagai solusi alternatif pengobatan penyakit bronkitis kronik yang tepat sasaran dan (iii) mampu mengatasi permasalahan lingkungan akibat limbah kulit kakao.

2. METODE

Alat dan Bahan

Pada penelitian ini digunakan bahan-bahan sebagai berikut: akuabides, limbah kulit kakao, asam asetat, kitosan, NaTPP dan etanol 96%. Sedangkan alat yang digunakan antara lain, aerator (Sinar Jaya Abadi, Medan), *Particle Size Analyzer* (Horiba Scientific, Nano Particle Analyzer SZ-100), pipet tetes, pipet volume, seperangkat alat gelas (Pyrex), spatula, *syringe pump* (SPLab02 Shenchen, China), dan timbangan analitik (Ohaus Pioneer PA214, China).

Tahapan Penelitian

Isolasi flavonoid kulit kakao

Tahap ini dilakukan isolasi flavonoid kulit kakao menggunakan teknik maserasi. Kulit kakao yang telah kering dihaluskan menggunakan alat *grinder*. Kemudian, serbuk kulit kakao yang mengandung flavonoid ditimbang sebanyak 40 gram lalu diisolasi dengan pelarut etanol 98% sebanyak 400mL dengan perbandingan antara sampel dengan etanol yaitu 1:10 selama 24 jam dengan distirer. Isolat kemudian disaring dan filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* untuk mendapatkan ekstrak kental flavonoid kulit kakao (Rohman, 2009). Kemudian dihitung % rendemen produk dengan persamaan (1).

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{Berat akhir sampel (g)}}{\text{Berat awal sampel (g)}} \times 100\% \quad (1)$$

Pembuatan larutan kitosan 0,1%; 0,3%; dan 0,4% b/v

Ditimbang sebanyak 0,1 g; 0,3 g dan 0,4 g kitosan, masing - masing dilarutkan dengan asam asetat 0,2 M dalam labu ukur 100 mL dan distirer selama 24 jam (Rahayu, 2016) ; (Tyagi et al, 2017).

Pembuatan larutan NaTPP 0,1% b/v

Ditimbang NaTPP sebanyak 0,1 g dilarutkan dengan akuades dalam labu

ukur 100 mL (Kaur, 2013) ; (Mandal et al, 2010).

Pembuatan sediaan nano spray ekstrak limbah kulit kakao

Ekstrak limbah kulit kakao sebanyak 0,2 g dilarutkan ke dalam 10 mL larutan kitosan dengan variasi konsentrasi 0,1%; 0,3% dan 0,4% (b/v). Setelah itu dilakukan penambahan 2,5 mL larutan NaTPP 0,1% b/v drop by drop dengan syring pump sambil dihomogenisasi menggunakan aerator dan stirer selama 30 menit (Putri dan Atun, 2017) ; (Rahayu, 2016).

Evaluasi dan Karakterisasi

Uji organoleptis

Uji organoleptis pada penelitian ini meliputi pengamatan terhadap warna (kekeruhan), bau dan bentuk sediaan koloid yang dihasilkan.

Uji Fitokimia

Uji senyawa flavonoid dilakukan dengan cara menambahkan serbuk Mg dan HCl pekat ke dalam ekstrak konsentrat kulit buah kakao. Apabila terbentuk warna orange, merah, atau kuning, berarti positif flavonoid (Harborne, 1996).

Uji alkaloid pada penelitian ini dilakukan menggunakan pereaksi Dragondoff. Pereaksi tersebut dibuat dengan melarutkan 0,8 g bismut (III) nitrat ke dalam 20 mL asam nitrat pekat. Pada wadah lain ditimbang sebanyak 27,2 g kalium idida lalu dilarutkan dalam 50 mL akuades, kemudian kedua larutan dicampurkan dan didiamkan sampai memisah sempurna. Larutan yang jernih diambil dan diencerkan dengan akuades sampai 100 mL. Selanjutnya, diambil 2 mL ekstrak konsentrat kulit buah kakao ditambahkan 1 mL pereaksi dragondoff dan dikocok. Alkaloid dianggap positif jika warna larutan menjadi orange.

Penentuan ukuran partikel

Penentuan ukuran partikel dilakukan menggunakan Particle Size Analyzer (PSA). Diambil 1 ml sediaan kemudian dilarutkan dalam 5 ml akuabides, diaduk perlahan hingga membentuk dispersi. Selanjutnya diukur diameter sebanyak 3 kali untuk masing-masing formula (Bathia, 2016).

Pengukuran zeta potensial

Diambil larutan sampel sebanyak 1 ml dilarutkan dengan akuabides dalam labu ukur 5 ml,

kemudian diukur zeta potensial menggunakan alat Particle Size Analyzer (PSA) sebanyak 3 kali untuk masing-masing formula (Rahayu, 2016).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Ekstraksi Kulit Kakao

Serbuk kulit kakao yang telah diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan etanol 98% sebagai pelarut, pelarut tersebut akan menarik senyawa sesuai kepolarannya. Proses

maserasi dilakukan selama 24 jam hingga larutan hasil ekstraksi jernih yang menandakan sudah tidak ada senyawa lagi yang dapat diekstrak oleh pelarut tersebut. Hasil ekstraksi yang diperoleh dilakukan pengujian secara organoleptis dan menguji kadar pelarut yang masih tertinggal dalam ekstrak. Uji organoleptik secara visual meliputi pemeriksaan bentuk, warna, dan bau dari ekstrak kulit kakao. dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Foto Hasil Ekstraksi Kulit Kakao

Berdasarkan hasil uji organoleptik meliputi pemeriksaan dari bentuk, warna, dan bau dari ekstrak kulit kakao, diketahui memiliki bentuk yang kental-kering, memiliki bau khas kakao, serta memiliki warna cokelat kehitaman. Adapun % rendemen yang diperoleh sebesar 21,91%.

Uji Fitokimia

Hasil uji fitokimia dari ekstrak kulit kakao seperti pada Tabel 1. menunjukkan bahwa ekstrak kulit kakao mengandung senyawa golongan flavonoid ditandai dengan adanya perubahan warna larutan menjadi merah dan tidak mengandung alkaloid karena larutan tidak berubah menjadi warna orange setelah penambahan reagen dragondoff.

Tabel 1. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Kulit Kakao

Nama	Uji Flavonoid		Uji Alkaloid	
	Warna Awal	Warna Akhir	Warna Awal	Warna Akhir
Ekstrak Kulit Kakao	Cokelat Pekat	Merah	Cokelat Pekat	Hijau

Karakterisasi Ukuran Partikel Menggunakan Particle Size Analyzer (PSA)

Karakterisasi PSA bertujuan untuk mengetahui ukuran partikel dalam

suatu sediaan. Tabel 2. menunjukkan hasil karakterisasi nanopartikel ekstrak kulit kakao yang diperoleh menggunakan metode gelasi ionik dengan variasi konsentrasi kitosan.

Tabel 2. Hasil Karakterisasi Ukuran Ekstrak Kulit Kakao

No.	Konsentrasi Kitosan	Ukuran Partikel (nm)	Polidispers Index
1	0,10%	470,7	0,392
2	0,30%	533,2	0,425
3	0,40%	569,3	0,569

Dari tabel tersebut menunjukkan adanya pengaruh ukuran partikel akibat peningkatan konsentrasi kitosan.

Semakin besar konsentrasi kitosan yang digunakan mengakibatkan semakin besar ukuran partikel, hal tersebut

sesuai dengan penelitian Mohanraj dan Chen (2006). Berdasarkan data, diketahui ukuran partikel yang diperoleh paling kecil yaitu menggunakan konsentrasi kitosan sebesar 0,1% yaitu sebesar 470,7 nm. Menurut Rawat et al (2006), suatu sediaan dapat dikategorikan sebagai nanopartikel jika memiliki ukuran dibawah 1000 nm, sehingga dapat dikatakan bahwa ekstrak kulit kakao yang diperoleh tergolong nanopartikel.

Nilai indeks polidispersitas berkisar antara 0 sampai 1, nilai PI mendekati 0 mengindikasikan dispersi yang homogen sedangkan jika nilai lebih dari 0.6 menunjukkan heterogenitas yang tinggi. Berdasarkan nilai indeks polidispersitas yang diperoleh dari pengukuran nanopartikel ekstrak kulit kakao tidak melebihi 0,6 sehingga mengindikasikan bahwa dispersi partikel bersifat cukup homogen.

Tabel 3. Hasil Karakterisasi Zeta Potensial Ekstrak Kulit Kakao

No.	Konsentrasi Kitosan	Zeta Potensial (mV)
1	0,10%	26,2
2	0,30%	24,8
3	0,40%	26,2

Potensi Sebagai Antibakteri Klebsiella Pneumoniae

Dari uji fitokimia yang dilakukan diketahui bahwa ekstrak kulit kakao mengandung senyawa flavonoid, dimana flavonoid merupakan salah satu senyawa yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Berdasarkan hasil penelitian Kandou (2016) menyebutkan bahwa flavonoid memberikan aktivitas antibakteri terhadap tikus yang diinfeksi bakteri *Klebsiella pneumoniae* penyebab penyakit bronkitis, sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak kulit kakao dapat sebagai antibakteri *klebsiella pneumoniae* penyebab bronkitis. Dengan membuat ekstrak kulit kakao yang mengandung flavonoid menjadi nanopartikel menyebabkan sistem kerja penyampaian senyawa aktif terhadap sel yang sakit lebih optimal lagi.

4. KESIMPULAN

Pembuatan nanospray isolat kulit kakao menggunakan metode gelasi ionik dengan bahan NaTPP 0,1% b/v dan variasi konsentrasi kitosan 0,1% b/v mampu menghasilkan sediaan koloid

Zeta Potensial

Penentuan zeta potensial merupakan parameter yang diperlukan untuk mengkarakterisasi sifat muatan permukaan dan menentukan stabilitas nanopartikel. Tabel 3. Merupakan hasil karakterisasi zeta potensial ekstrak kulit kakao menggunakan PSA. Nilai zeta potensial menunjukkan sistem koloid yang stabil yaitu berkisar (+) 30 mV atau dibawah (-) 30 mV karena jika semakin besar muatan permukaan suatu partikel maka dapat mencegah terjadinya agregasi partikel berdasarkan pada gaya tolak-menolak eletrostatik. Berdasarkan Tabel 3. menunjukkan bahwa zeta potensial semua variasi konsentrasi kitosan yang digunakan untuk membuat agar sediaan tergolong nanopartikel dibawah (+) 30 mV, hal tersebut berarti koloid yang diperoleh bersifat stabil.

dengan ukuran partikel paling kecil yaitu sebesar 470,7 nm dan positif mengandung flavonoid sebagai antibakteri *Klebsiella pneumoniae* penyebab penyakit bronkitis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami sampaikan kepada Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi yang telah mendanai penelitian ini melalui Program Kreativitas Mahasiswa Penelitian Eksakta (PKM-PE) tahun 2017.

DAFTAR PUSTAKA

1. Afiati, N. F. (2016). *Survei Perokok dan Kondisi Kesehatan Perokok Di Wilayah Rural (Desa Cilebut Barat Kabupaten Bogor) dan Urban (Kelurahan Kalibata Kota Jakarta Selatan) Tahun 2015.*
2. Aifin, H., Anggraini, N., Handayani, D. & Rasyid R. 2006. Standarisasi Ekstrak Etanol Daun *Eugenia Cumini Merr.* Journal of science technology. 11: 88-93.
3. Anonim. 2005. *Pharmaceutical Care Untuk Penyakit Infeksi*

- Saluran Pernapasan. Depkes RI, Jakarta.
4. Bathia, S., 2016, *Nanoparticles Types, Classification, Characterization, Fabrication Methods and Drug Delivery Applications*, Springer Int. Publ. Switz, 29, 32–91. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41129-3_2
 5. Departemen Kesehatan RI. 2009. *Pedoman Pelayanan Antenatal di Tingkat Pelayanan Dasar*. Jakarta: Depkes RI.
 6. Direktorat Bina Farmasi Komunitas dan Klinik. 2005. *Pharmaceutical Care Untuk Penyakit Infeksi Saluran Pernapasan*. Direktorat Jenderal Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan Departemen Kesehatan RI. Jakarta
 7. Harborne, J. B. 1996. *Metode Fitokimia*. ITB. Bandung.
 8. Hu, M. dan Li, X., 2011, *Oral bioavailability : basic principles, advance concept, and application*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 32-33
 9. Ikawati, Z. 2011. *Penyakit Sistem Pernafasan dan Tatalaksana Terapinya*. Bursa Ilmu. Yogyakarta
 10. Kandou, L. A. (2016). *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Rimpang Lengkuas Merah (Alpinia Purpurata (Vieill) K. Schum) Terhadap Bakteri Klebsiella Pneumoniae Isolat Sputum Penderita Bronkitis Secara In Vivo*. Pharmacon, 5(3).
 11. Kaur, K., 2013, *Formulation and Evaluation of Metformin Hydrochloride Microsphere by Ionotropic Gelation Technique*, Thapar University: India, 25-26.
 12. Listyannisa, A., 2012, *Isolasi Senyawa Antioksidan dari Kulit Buah Coklat (Theobroma cacao L.)*, *Skripsi*, Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jenderal Achmad Yani, Cimahi.
 13. Mandal, S., Kumar, S.S., Krishnamoorthy, B., Basu, S.K., 2010, *Development and evaluation of calcium alginate beads prepared by sequential and simultaneous methods*, *Braz. J. Pharm. Sci.* 46, 785–793.
 14. Mohanraj, V.J. and Y. Chen. 2006. *Nanoparticles : A Review*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5 :1.
 15. Mulyatni, A. S., Budiani, A., & Taniwiryo, D. (2016). *Aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah kakao (Theobroma cacao L.) terhadap Escherichia coli, Bacillus subtilis, dan Staphylococcus aureus*. *E-Journal Menara Perkebunan*, 80(2).
 16. Purnama, I.N., 2004, *Kajian Potensi Isolat Kapang Pemecah Ikatan Tanin Pada Kulit Buah Kakao (Theobroma cacao L.)*, *Skripsi*, Program Studi Nutrisi dan Makanan Ternak, Departemen Ilmu Nutrisi dan Makanan Ternak, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
 17. Putri, G.M., Atun, S., 2017, *Pembuatan Dan Karakterisasi Nanopartikel Ekstrak Etanol (Boesenbergia pandurata) Pada Berbagai Variasi Komposisi Alginat*, *J. Kim. Dasar* 6, 20–26.
 18. Rahayu, E., 2016, *Preparasi Dan Karakterisasi Nanosuspensi Kitosan-Tripolifosfat Sebagai Pembawa Deksametason Natrium Fosfat Menggunakan Metode Gelasi Ionik*, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta.
 19. Rawat, M., Singh, D., Saraf, S., 2006. *Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs*, *Pharm. Soc. Jpn.* 29, 1790–1798.
 20. Rohman, Saepul. 2009. *Teknik Fermentasi Dalam Pengolahan Kakao*. www.majarimagazine.com (Diakses tanggal 20 Januari 2013)
 21. Roihanah, S., Sukoso, S., & Andayani, S. (2012). *Aktivitas Antibakteri Ekstrak Teripang Holothuria sp Terhadap Bakteri Vibrio harveyi Secara In vitro*. *The Journal of Experimental Life Science*, 2(1), 1-5.
 22. Setiabudy, R. 2007. *Antimikroba : Dalam Farmakologi dan Terapi*. Edisi 5 (Cetakan Ulang Dengan Perbaikan, 2008). Balai Penerbit FK UI. Jakarta
 23. Tjitrosoepomo, S., 1988. *Budidaya kakao*, Kansius. Yogyakarta.
 24. Tyagi, L.K., Shekhar, R., Gaur, K., Kori, M.L., 2017, *Development and In-Vitro Characterization of*

Kalsium alginate Beads of Oxytetracycline Hydrochloride for Oral Use: Effect of Process Variables, *Am. J. Pharmacol. Sci.* 5, 63–70.

25. Wadhwa, J., Nair, A., Kumria, R., 2011. Self-emulsifying therapeutic system: a potential approach for delivery of lipophilic drugs. *Braz. J. Pharm. Sci.* 47, 447–465.
26. WHO. 2014. *Global Status Report on Noncommunicable Diseases 2014*. Geneva: WHO Press.