



PERBANDINGAN METODE EKSTRAKSI TERHADAP KARAKTERISTIK SENYAWA, AKTIVITAS ANTIOKSIDAN, DAN ANTIBAKTERI EKSTRAK KULIT KAKAO (*Theobroma cacao* L.)

COMPARISON OF EXTRACTION METHODS ON THE CHARACTERISTICS OF COMPOUNDS, ANTIOXIDANT ACTIVITY, AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF COCOA POD HUSK EXTRACT (*Theobroma cacao* L.)

Anugrah Fasha¹, Ramadhan Triyandi^{1*}, Femmy Andrifianie¹, Muhammad Iqbal¹

¹Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung

ABSTRAK

Pendahuluan: Indonesia sebagai salah satu produsen utama kakao dunia menghasilkan limbah kulit kakao sekitar $\pm 75\%$ dari total berat buah, yang berpotensi menimbulkan permasalahan lingkungan apabila tidak dimanfaatkan secara optimal. Limbah kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) diketahui mengandung berbagai senyawa fitokimia yang berpotensi memiliki aktivitas antioksidan dan antibakteri. Potensi ini menjadi penting terutama dalam pengembangan agen antibakteri alami terhadap *Klebsiella pneumoniae*, yaitu bakteri Gram-negatif penghasil enzim *Extended-Spectrum Beta-Lactamase* (ESBL) yang diketahui memiliki tingkat resistensi tinggi terhadap berbagai antibiotik. Selain itu, metode dan kondisi ekstraksi, termasuk perbedaan suhu dan teknik ekstraksi, dapat mempengaruhi kandungan senyawa bioaktif yang dihasilkan serta aktivitas biologis ekstrak yang diperoleh. **Metode:** Kulit kakao dari Kecamatan Adiluwih, Kabupaten Pringsewu, diekstrak dengan etanol 96% menggunakan maserasi (rasio 1:10; 24 jam) dan *Ultrasound-Assisted Extraction* (UAE; rasio 1:10; 50°C). Aktivitas antioksidan diuji metode DPPH (IC₅₀), antibakteri difusi sumuran terhadap *K. pneumoniae*, dan karakterisasi senyawa GC-MS. **Hasil:** Meskipun metode *Ultrasound-Assisted Extraction* menghasilkan 26 senyawa dengan nilai IC₅₀ sebesar 665,133 $\mu\text{g/mL}$ dan zona hambat sebesar $1,55 \pm 0,15$ mm, sedangkan metode maserasi menghasilkan 58 senyawa dengan nilai IC₅₀ sebesar 476,681 $\mu\text{g/mL}$ dan zona hambat sebesar $0,75 \pm 0,327$ mm, hasil analisis statistik menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan signifikan pada aktivitas antioksidan maupun aktivitas antibakteri terhadap *Klebsiella pneumoniae*. **Kesimpulan:** Kedua metode ekstraksi menunjukkan potensi aktivitas antioksidan dan antibakteri, maserasi lebih efektif dalam menghasilkan senyawa bioaktif yang lebih banyak. Pemilihan metode ekstraksi yang tepat dapat bergantung pada kebutuhan aplikasi praktis, seperti pengolahan limbah kakao atau pengembangan produk kesehatan.

Kata Kunci: Kulit kakao, antioksidan, antibakteri, *Klebsiella pneumoniae*

ABSTRACT

Introduction: Indonesia, one of the world's major cocoa producers, generates cocoa pod husk waste of approximately $\pm 75\%$ of the total fruit weight, which may cause environmental problems if not properly utilized. Cocoa husk (*Theobroma cacao* L.) contains phytochemical compounds with potential antioxidant and antibacterial activities. This potential is important for developing natural antibacterial agents against *Klebsiella pneumoniae*, a Gram-negative bacterium producing *Extended-Spectrum Beta-Lactamase* (ESBL) enzymes and showing high antibiotic resistance. Extraction methods and conditions

may influence the bioactive compounds and biological activities obtained. **Methods:** Cocoa husks from Adiluwih District, Pringsewu Regency, were extracted with 96% ethanol using maceration (1:10; 24 h) and Ultrasound-Assisted Extraction (UAE; 1:10; 50 °C). Antioxidant activity was determined using the DPPH method (IC_{50}), antibacterial activity by well diffusion against *Klebsiella pneumoniae*, and compound characterization using GC-MS. **Results:** UAE produced 26 compounds with an IC_{50} of 665.133 $\mu\text{g/mL}$ and an inhibition zone of 1.55 ± 0.15 mm, while maceration produced 58 compounds with an IC_{50} of 476.681 $\mu\text{g/mL}$ and an inhibition zone of 0.75 ± 0.327 mm. Statistical analysis showed no significant differences in antioxidant or antibacterial activity against *Klebsiella pneumoniae*. **Conclusion:** Both extraction methods showed antioxidant and antibacterial potential, although maceration produced a greater number of bioactive compounds. The choice of extraction method may depend on practical applications such as cocoa waste utilization or health-related product development. **Keywords:** Cocoa pod husk, antioxidant, antibacterial, *Klebsiella pneumoniae*

apt. Ramadhan Triyandi, M.Si : Universitas Lampung, Jl. Prof. Dr. Sumantri Brojonegoro No. 1 Bandar Lampung. 081273424287. ramadhan.triyandi0101@fk.unila.ac.id

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu produsen kakao terbesar di dunia. Berdasarkan laporan *International Cocoa Organization* pada tahun 2023, Indonesia menempati urutan keempat sebagai produsen biji kakao terbesar di dunia dan merupakan produsen kakao terbesar di kawasan Asia dengan total produksi mencapai 632,12 ribu ton. Produksi kakao di Indonesia tersebar di berbagai wilayah, salah satunya Provinsi Lampung yang menyumbang sekitar 7,22% dari total produksi kakao nasional (1).

Tingginya produksi kakao tersebut menghasilkan limbah biomassa dalam jumlah besar, terutama kulit kakao yang mencapai sekitar 75% dari total berat buah. Limbah kulit kakao yang tidak dimanfaatkan secara optimal dapat menumpuk dan berpotensi mencemari

lingkungan. Namun demikian, kulit kakao diketahui mengandung berbagai senyawa metabolit sekunder yang berpotensi dimanfaatkan dalam bidang kesehatan, seperti senyawa fenolik, flavonoid, alkaloid, saponin, terpenoid, dan steroid yang memiliki aktivitas biologis sebagai antioksidan dan antibakteri (2–5).

Aktivitas antioksidan dari senyawa metabolit sekunder berperan dalam menangkal radikal bebas yang dapat memicu terjadinya stres oksidatif. Kondisi stres oksidatif yang berlangsung secara terus-menerus dapat menurunkan sistem imun tubuh dan meningkatkan kerentanan terhadap berbagai penyakit, termasuk infeksi bakteri pada saluran pernapasan. Salah satu bakteri penyebab infeksi saluran pernapasan adalah *Klebsiella pneumoniae*, yaitu bakteri Gram-negatif

yang diketahui mampu menghasilkan enzim *Extended Spectrum Beta-Lactamases* (ESBL) yang dapat menghidrolisis antibiotik golongan beta-laktam sehingga menyebabkan resistensi antibiotik (6,7), meningkatnya kasus resistensi antibiotik mendorong perlunya pengembangan agen antibakteri alternatif yang berasal dari bahan alam dengan efek samping yang relatif lebih rendah (8).

Beberapa penelitian sebelumnya telah melaporkan bahwa ekstrak kulit kakao memiliki aktivitas antibakteri terhadap beberapa bakteri patogen. Ekstrak kulit kakao dilaporkan mampu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus epidermidis* dengan diameter zona hambat sebesar $3,13 \pm 0,43$ mm serta *Propionibacterium acnes* sebesar $3,25 \pm 0,33$ cm pada konsentrasi 100%. Selain itu, ekstraksi menggunakan metode *Ultrasound-Assisted Extraction* pada konsentrasi 60% juga dilaporkan mampu menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans* dengan diameter zona hambat sebesar $8,44 \pm 1,53$ mm (9–11).

Di sisi lain, metode ekstraksi diketahui dapat mempengaruhi jenis dan jumlah senyawa bioaktif yang dihasilkan. Perbedaan teknik dan kondisi ekstraksi, termasuk suhu, dapat

mempengaruhi kandungan total fenolik dan flavonoid dalam ekstrak. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa metode ekstraksi dengan penerapan suhu mampu menghasilkan kandungan total fenolik sebesar $82,44 \pm 2,67$ mg GAE/g dan total flavonoid sebesar $206,3 \pm 4,65$ mg QE/g, serta aktivitas antioksidan metode DPPH dengan nilai IC_{50} sebesar $0,73 \pm 0,014$ mg/mL (12).

Meskipun beberapa penelitian telah melaporkan aktivitas antibakteri ekstrak kulit kakao terhadap beberapa bakteri patogen, kajian mengenai potensi antibakterinya terhadap *Klebsiella pneumoniae* masih sangat terbatas. Selain itu, sebagian besar penelitian hanya menggunakan satu metode ekstraksi tanpa melakukan perbandingan terhadap metode lain yang berpotensi menghasilkan karakteristik senyawa bioaktif yang berbeda. Oleh karena itu, penelitian yang membandingkan metode maserasi dan *Ultrasound-Assisted Extraction* terhadap karakteristik senyawa serta aktivitas antibakteri ekstrak kulit kakao terhadap *Klebsiella pneumoniae* masih diperlukan.

METODE

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Analisis Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung untuk proses ekstraksi sampel hingga pengujian aktivitas antioksidan; di Laboratorium Kesehatan Daerah Provinsi Lampung untuk pengujian aktivitas antibakteri; serta di Invalab Biosains Indonesia, Bogor untuk karakterisasi senyawa. Penelitian ini dilaksanakan selama 4 (empat) bulan, yaitu pada periode September 2025 hingga Desember 2025.

Alat

Ultrasonic bath (OVAN[®]), rotary evaporator (Rotavapor R-100 BUCHI[®]), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu[®] UV-1900i), GC-MS (Perkin Elmer[®] Clarus 500–Clarus SQ 8S), dan Kuvet (Shimadzu[®]).

Bahan

Etanol 96%, simplisia kulit kakao (*Theobroma cacao* L.), bubuk DPPH (sigma) asam askorbat pa (Merck), dimetil sulfoksida/DMSO (Merck), media *Mueller Hinton Agar/MHA*, Nutrient Broth/NB. bakteri *Klebsiella pneumoniae*, serta tablet ciprofloxacin 500 mg (generik farmasi).

Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit kakao

(*Theobroma cacao* L.) yang diperoleh dari tanaman kakao yang tumbuh di Kecamatan Adiluwih, Kabupaten Pringsewu. Kulit kakao yang digunakan dipilih dari buah kakao yang masih utuh dan segar sebagai upaya untuk memastikan kualitas bahan penelitian. Buah kakao yang dipilih memiliki variasi warna kulit mulai dari hijau, kuning kecoklatan, hingga merah.

Determinasi Sampel dan Persiapan Sampel

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Botani FMIPA Universitas Lampung untuk memastikan keaslian spesies. Selanjutnya, kulit kakao dipisahkan dari bagian yang tidak digunakan, dicuci dengan air mengalir, dikeringkan di tempat teduh, kemudian dihaluskan menggunakan blender hingga diperoleh serbuk simplisia.

Ekstraksi

Serbuk simplisia kulit kakao (*Theobroma cacao* L.) diekstraksi menggunakan dua metode, yaitu metode maserasi dan *Ultrasound-Assisted Extraction* (UAE). Pada metode maserasi, serbuk simplisia diekstraksi menggunakan etanol 96% dengan rasio bahan terhadap pelarut 1:10 selama 72 jam untuk memaksimalkan senyawa

yang terekstrak (13). Selama proses maserasi, campuran diaduk setiap 6 jam dan pelarut diganti setiap 24 jam untuk mengoptimalkan proses ekstraksi senyawa bioaktif. Setelah proses maserasi selesai, filtrat disaring kemudian diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 50 °C, tekanan 175 mbar, dan kecepatan 80 rpm hingga diperoleh ekstrak kental (13).

Pada metode UAE, sebanyak 25 g serbuk simplisia diekstraksi menggunakan etanol 96% dengan rasio 1:10 menggunakan bantuan gelombang ultrasonik 40 kHz dengan daya 100 watt selama 30 menit pada suhu 55°C, kemudian filtrat disaring dan diuapkan menggunakan rotary evaporator dengan kondisi yang sama, dan proses ekstraksi dilakukan sebanyak tiga kali untuk memaksimalkan perolehan senyawa (14,15).

Skrining Fitokimia

Ekstrak kental diuji secara kualitatif untuk mendeteksi alkaloid (Dragendorff), fenolik (iodine), flavonoid (Shinoda dan H₂SO₄), saponin (uji buih), tanin (Braymer), serta steroid dan terpenoid (Salkowski) (16).

Karakterisasi Senyawa Menggunakan Instrumen GC-MS

Analisis dilakukan menggunakan PerkinElmer Clarus 500–SQ 8S GC–MS dengan kolom Elite-5ms dan gas helium sebagai gas pembawa. Senyawa yang terdeteksi diidentifikasi berdasarkan spektra massa, yaitu dengan membandingkan pola fragmentasi ion yang dihasilkan dengan membandingkan pola fragmentasi ion terhadap spektrum referensi dalam basis data GC–MS Hasil identifikasi senyawa kemudian disajikan secara deskriptif dalam bentuk tabel (17).

Uji Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan metode DPPH. Larutan DPPH disiapkan dengan melarutkan 15,77 mg serbuk DPPH dalam methanol p.a, hingga volume 100 mL dan disimpan dalam kondisi terlindung dari cahaya. Larutan ekstrak kulit kakao dibuat dalam larutan stok 1000 ppm, kemudian diencerkan menjadi konsentrasi 100, 150, 200, 250, dan 300 ppm. Sebanyak 1 mL larutan sampel dicampurkan dengan 1 mL methanol p.a. dan 2 mL larutan DPPH, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada kondisi gelap. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm dengan tiga kali replikasi. Asam askorbat digunakan sebagai kontrol

positif dengan konsentrasi yang sama dan diperlakukan dengan prosedur yang serupa (18,19).

Tahapan/Jalannya Penelitian

Uji aktivitas antibakteri diawali dengan sterilisasi seluruh alat menggunakan autoklaf, oven, dan pemanasan bunsen sesuai prosedur standar (20). Media *Mueller Hinton Agar* kemudian disiapkan dan disterilkan, sementara suspensi bakteri *Klebsiella pneumoniae* distandarisasi hingga setara dengan *McFarland* 0,5 (21). Pengujian antibakteri dilakukan menggunakan metode sumuran menggunakan lubang sumuran sebesar 6 mm dan volume sebanyak 100 mikroliter pada setiap lubang sumuran, dengan setiap cawan diisi kontrol positif berupa ciprofloxacin 0,2%, kontrol negatif DMSO 10%, serta ekstrak pada konsentrasi 10%, 20%, 30%, dan 100%. Seluruh cawan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian diameter zona hambat yang terbentuk diukur sebagai indikator aktivitas antibakteri (22).

Analisa Data

Analisis data dilakukan untuk membandingkan karakteristik senyawa, aktivitas antioksidan, dan aktivitas antibakteri ekstrak kulit kakao hasil

metode maserasi dan *Ultrasound-Assisted Extraction*. Uji normalitas data dilakukan menggunakan uji *Shapiro-Wilk test*. Data yang berdistribusi normal ($p > 0,05$) dianalisis menggunakan *Independent t-test*, sedangkan data yang tidak berdistribusi normal dianalisis menggunakan *Mann-Whitney U test* karena tidak memenuhi asumsi distribusi normal. Seluruh analisis dilakukan dengan tingkat signifikansi $p < 0,05$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi kulit kakao (*Theobroma cacao* L.) dilakukan dengan metode maserasi dan *Ultrasound-Assisted Extraction* (UAE) menggunakan rasio simplisia: pelarut 1:10 dengan etanol 96% dan menghasilkan ekstrak kental berwarna coklat. Maserasi dilakukan selama 24 jam tanpa pemanasan, sehingga mampu meminimalkan degradasi senyawa yang tidak tahan panas dan memungkinkan kontak pelarut yang lama untuk mengekstraksi beragam metabolit sekunder (23).

Sementara itu, metode *Ultrasound-Assisted Extraction* (UAE) dilakukan pada suhu 50 °C selama 30 menit untuk meningkatkan efisiensi ekstraksi senyawa bioaktif seperti alkaloid, fenolik, flavonoid, tanin,

steroid, dan terpenoid. Gelombang ultrasonik menghasilkan efek kavitasasi yang membantu merusak dinding sel tanaman sehingga mempercepat pelepasan senyawa ke dalam pelarut. Suhu 50 °C dipilih sebagai kondisi yang dapat meningkatkan kelarutan dan

difusi senyawa, namun tetap meminimalkan degradasi senyawa sensitif panas seperti fenolik dan flavonoid yang dapat terurai pada suhu lebih tinggi atau waktu ekstraksi yang terlalu lama (14,24,25).

Tabel 1. Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Kulit Kakao (*Theobroma cacao* L.)

No.	Golongan Senyawa	Pereaksi	Hasil	
			Maserasi	UAE
1.	Alkaloida	Dragendorf	+	+
2.	Flavonoida	Mg(s) + HCl (p)	+	+
3.	Saponin	S + Aquadest	+	+
4.	Tanin	FeCl ₃ 5%	-	-
5.	Steroid dan Terpenoid	S+ CHCl ₃ + H ₂ SO ₄	+	+

Keterangan :

(+): terdeteksi adanya golongan senyawa.

(-): tidak terdeteksi adanya golongan senyawa

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi golongan metabolit sekunder pada ekstrak kulit kakao hasil maserasi dan *Ultrasound-Assisted Extraction*. Hasil pengujian pada **Tabel 1** menunjukkan bahwa kedua ekstrak memiliki profil senyawa fitokimia yang relatif sama, yaitu negatif terhadap tanin, namun positif mengandung alkaloid, fenolik, flavonoid, saponin, steroid, dan terpenoid. Keberadaan alkaloid dibuktikan melalui uji Dragendorff yang menghasilkan endapan coklat dan perubahan warna oranye akibat

pembentukan kompleks antara atom nitrogen alkaloid dengan ion logam (26). Terdeteksinya saponin pada kedua metode ekstraksi diduga karena sifat saponin yang bersifat polar dan memiliki gugus glikosida yang meningkatkan kelarutannya sehingga mudah larut dalam pelarut polar seperti etanol (27). Sebaliknya, tanin tidak terdeteksi pada kedua ekstrak, yang kemungkinan disebabkan oleh kadar tanin yang relatif rendah dalam sampel atau kurang optimalnya kondisi ekstraksi. Jenis pelarut diketahui sangat memengaruhi kemampuan ekstraksi tanin, dimana senyawa ini umumnya

lebih mudah terekstraksi menggunakan pelarut yang sangat polar seperti air dibandingkan pelarut alkohol seperti etanol (28).

Senyawa flavonoid teridentifikasi melalui uji magnesium-HCl yang menghasilkan perubahan warna kuning sebagai indikasi terbentuknya senyawa tereduksi flavilium (29). Kandungan saponin ditunjukkan oleh terbentuknya busa stabil setelah pengocokan akibat sifat surfaktan senyawa saponin (30). Sementara itu, keberadaan steroid dan terpenoid dikonfirmasi melalui uji Salkowski, di mana penambahan H₂SO₄ pekat memicu pembentukan sistem karbokation terkonjugasi pada struktur steroid dan terpenoid sehingga menghasilkan kompleks berwarna merah pada lapisan bawah larutan sebagai indikator positif (31,32).

Karakterisasi senyawa menggunakan GC-MS pada **Tabel 2** menghasilkan senyawa yang lebih beragam dibandingkan metode *Ultrasound-Assisted Extraction*, dengan total 58 senyawa terdeteksi. Tiga senyawa dominan dalam ekstrak maserasi adalah *γ-sitosterol* (13,82%), *γ-sitostenone* (12,72%), dan *hexadecanoic acid methyl ester* (9,82%). *γ-Sitostenone* merupakan fitosterol yang dilaporkan memiliki aktivitas larvisidal signifikan terhadap

larva *Culex quinquefasciatus*, dengan mekanisme yang diduga melibatkan efek sinergis dengan komponen lain dalam ekstrak sehingga meningkatkan toksisitas terhadap larva dan berpotensi menekan risiko resistensi insektisida kimia. Mekanisme kerjanya dalam antibakteri diduga berkaitan dengan kemampuannya berinteraksi dengan komponen lipid membran sel mikroba sehingga dapat mengganggu integritas membran dan meningkatkan permeabilitas sel bakteri (33). Sementara itu, *hexadecanoic acid methyl ester*, yang merupakan turunan metil ester dari asam palmitat, termasuk golongan asam lemak yang berperan dalam stabilitas membran dan penyimpanan energi, serta dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan melalui mekanisme donasi hidrogen dan perlindungan lapisan lipid terhadap serangan radikal bebas serta melindungi lapisan lipid membran dari proses peroksidasi (34). Keberadaan senyawa-senyawa tersebut menunjukkan bahwa metode maserasi mampu mengekstraksi komponen lipofilik dan semi-polar yang berpotensi berkontribusi terhadap aktivitas antioksidan melalui penangkapan radikal bebas serta aktivitas antibakteri melalui gangguan terhadap struktur membran sel bakteri.

Tabel 2. Karakterisasi Senyawa Ekstrak Metode Maserasi dengan GC-MS

No.	Nama Senyawa	Rumus Molekul	RT (<i>Retention Time</i>)	Area (%)
1.	<i>.γ.-Sitosterol</i>	C ₂₉ H ₅₀ O	21.342	13,82
2.	<i>.γ.-Sitostenone</i>	C ₂₉ H ₄₈ O	22.276	12,72
3.	<i>Hexadecanoic acid, methyl ester</i>	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	13.566	9,82

Ekstrak metode *Ultrasound-Assisted Extraction* pada **Tabel 3** menghasilkan jumlah senyawa terdeteksi yang lebih sedikit, yaitu 26 senyawa, dengan komponen utama *D-fructose, 3-O-methyl-* (82,97%), *γ-sitosterol* (4,62%), dan *propanoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-, ethyl ester* (1,38%). Dominasi *D-fructose, 3-O-methyl-* mengindikasikan bahwa UAE cenderung mengekstraksi senyawa polar dan metabolit primer, yang dipengaruhi oleh efek kavitasi ultrasonik yang menyebabkan kerusakan dinding sel sehingga memfasilitasi pelepasan senyawa berukuran besar maupun kecil (35,36). *γ-Sitosterol*, sebagai senyawa dominan kedua, merupakan sterol lipofilik dengan aktivitas farmakologis, fitosterol lipofilik yang dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri melalui

mekanisme gangguan pada struktur lipid membran sel mikroba sehingga meningkatkan permeabilitas membran dan menghambat pertumbuhan bakteri, juga memiliki potensi sitotoksik terhadap sel kanker kolon dan hati melalui induksi apoptosis dan modulasi ekspresi gen *c-myc*, sehingga berpotensi dikembangkan sebagai kandidat agen antikanker (37). Sementara itu, turunan *propanoic acid* yang terdeteksi sebagai hasil derivatisasi GC-MS dilaporkan berpotensi berinteraksi dengan protein yang terlibat dalam regulasi angiogenesis, senyawa ini juga berkontribusi terhadap aktivitas antibakteri melalui mekanisme penurunan pH mikro lingkungan serta gangguan terhadap keseimbangan metabolisme sel bakteri (38).

Tabel 3. Karakterisasi Senyawa Ekstrak Metode *Ultrasound-Assisted Extraction* dengan GC-MS

No.	Nama Senyawa	Pereaksi	RT	Area (%)
1.	<i>D-Fructose, 3-O-methyl-</i>	C ₇ H ₁₄ O ₆	12,347	82,97

2.	<i>γ-Sitosterol</i>	C ₂₉ H ₅₀ O	21,331	4,62
3.	<i>Propanoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-, ethyl ester</i>	C ₈ H ₁₈ O ₃ Si	10,057	1,38

Uji aktivitas antioksidan pada **Tabel 4** menunjukkan bahwa ekstrak kulit kakao hasil maserasi memiliki nilai IC₅₀ sebesar 476,681 µg/mL, lebih rendah dibandingkan ekstrak *Ultrasound-Assisted Extraction* (UAE) yaitu 665,133 µg/mL. Hasil ini menunjukkan bahwa metode maserasi memiliki aktivitas antioksidan yang relatif lebih baik. Perbedaan ini diduga berkaitan dengan kandungan senyawa fenolik dan flavonoid yang lebih tinggi pada ekstrak maserasi, yang berperan sebagai donor hidrogen dalam menetralkan radikal bebas DPPH. Selain itu, proses maserasi dilakukan tanpa pemanasan sehingga stabilitas gugus hidroksil pada senyawa fenolik lebih terjaga dan kemampuan menangkap radikal bebas tetap optimal (39–41). Analisis GC–MS juga menunjukkan adanya senyawa fenolik seperti *2-methoxy-4-vinylphenol* dan *isolemicin* yang diketahui memiliki aktivitas antioksidan melalui mekanisme penangkapan radikal bebas dan penghambatan reaksi oksidasi berantai (42,43).

Sebaliknya, aktivitas antioksidan ekstrak UAE cenderung lebih rendah.

Meskipun metode ini meningkatkan efisiensi ekstraksi melalui efek kavitas ultrasonik yang merusak dinding sel dan mempercepat difusi pelarut, penggunaan suhu selama proses ekstraksi berpotensi menyebabkan degradasi sebagian senyawa fenolik dan flavonoid yang bersifat sensitif terhadap panas. Degradasi ini dapat menurunkan kemampuan senyawa dalam mendonorkan atom hidrogen untuk menetralkan radikal bebas (35,36). Meskipun demikian, analisis GC–MS masih menunjukkan keberadaan beberapa senyawa antioksidan seperti *L-ascorbic acid dihexadecanoate* dan *α-tocopheryl acetate*, namun kandungannya relatif kecil sehingga kontribusinya terhadap aktivitas antioksidan total menjadi terbatas (44,45).

Hasil uji normalitas *Shapiro–Wilk* menunjukkan bahwa data maserasi memiliki *p-value* 0,034, sehingga tidak berdistribusi normal, sedangkan data UAE memiliki *p-value* 0,276. Oleh karena itu, analisis dilanjutkan menggunakan uji non-parametrik *Mann–Whitney U*. Hasil uji menunjukkan nilai *p-value* sebesar 0,05 yang menandakan tidak terdapat

perbedaan signifikan aktivitas ekstraksi antioksidan antara kedua metode

Tabel 4. Hasil Uji Antioksidan

Sampel	IC ₅₀ (µg/ml)	Keterangan
Maserasi	476,681	Sangat lemah
<i>Ultrasound-Assisted Extraction</i>	665,133	Sangat lemah
Asam Askorbat	2,786	Sangat kuat

Hasil uji antibakteri pada Tabel 5 menunjukkan bahwa ekstrak kulit kakao metode maserasi menghasilkan zona hambat maksimum sebesar $0,75 \pm 0,327$ mm pada konsentrasi 100%, yang tergolong sangat lemah. Diameter hambat diukur menggunakan jangka sorong digital secara horizontal dan vertikal sebagai zona bening di sekitar sumuran setelah inkubasi, yang menunjukkan kemampuan ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Berdasarkan analisis GC-MS, ekstrak maserasi mengandung senyawa yang cukup beragam, namun didominasi oleh γ -sitosterol, γ -sitostenone, dan turunan asam lemak seperti *hexadecanoic acid methyl ester*. Senyawa-senyawa tersebut diketahui memiliki aktivitas biologis, namun bukan sebagai antibakteri utama dan lebih banyak dilaporkan berperan dalam aktivitas sitotoksik atau larvisidal. Meskipun golongan steroid, terpenoid,

dan asam lemak dapat mengganggu integritas membran sel mikroba, kandungan senyawa aktif yang relatif rendah serta kompleksitas dinding sel *Klebsiella pneumoniae* sebagai bakteri Gram-negatif menyebabkan kemampuan hambat ekstrak menjadi terbatas (33,37).

Ekstrak hasil *Ultrasound-Assisted Extraction* menunjukkan zona hambat maksimum $1,55 \pm 0,15$ mm, yang juga termasuk kategori sangat lemah. Profil senyawa hasil GC-MS didominasi oleh *D-fructose, 3-O-methyl-*, yaitu senyawa gula polar yang tidak memiliki aktivitas antibakteri dan mudah larut dalam pelarut polar. Dominasi senyawa gula ini dapat menjelaskan rendahnya aktivitas antibakteri ekstrak, karena senyawa tersebut tidak berperan sebagai inhibitor pertumbuhan bakteri. Selain itu, struktur dinding sel *Klebsiella pneumoniae* yang tersusun dari lapisan lipopolisakarida dan kapsul polisakarida

diketahui dapat menghambat penetrasi senyawa antibakteri dari luar sel, sehingga ekstrak dengan kandungan senyawa aktif rendah cenderung menunjukkan aktivitas hambat yang minimal. (35,46–48).

Sebagai pembanding, ciprofloxacin sebagai kontrol positif menunjukkan aktivitas antibakteri yang jauh lebih kuat. Antibiotik golongan fluoroquinolone ini bekerja dengan menghambat enzim DNA gyrase dan topoisomerase IV, sehingga mengganggu proses replikasi dan transkripsi DNA bakteri yang pada

akhirnya menyebabkan kematian sel. (49,50).

Analisis statistik diawali dengan uji normalitas *Shapiro–Wilk*, yang menunjukkan salah satu kelompok data memiliki *p-value* < 0,05, sehingga data tidak berdistribusi normal. Oleh karena itu, analisis dilanjutkan menggunakan uji non-parametrik *Mann–Whitney U*, yang menunjukkan tidak terdapat perbedaan signifikan aktivitas antibakteri antara metode maserasi dan *Ultrasound-Assisted Extraction*.

Tabel 5. Hasil Uji Antibakteri

Perlakuan	Hasil (milimeter/mm)		Klasifikasi Zona Hambat
	X ±SD		
Kontrol negatif (DMSO 10%)	0±0		Tidak Ada
Kontrol positif (Ciprofloxacin)	45,25±4,903		Sangat Kuat
Maserasi 10%	0±0		Tidak Ada
Maserasi 20%	0,117±0,115		lemah
Maserasi 30%	0,20±0,173		Lemah
Maserasi 100%	0,75±0,327		Lemah
<i>Ultrasound-Assisted Extraction</i> 10%	0,167±0,288		Lemah
<i>Ultrasound-Assisted Extraction</i> 20%	0,35±0,304		Lemah
<i>Ultrasound-Assisted Extraction</i> 30%	1,55± 0,15		Lemah
<i>Ultrasound-Assisted Extraction</i> 100%	0,567± 0,202		Lemah

KESIMPULAN

Ekstraksi kulit kakao (*Theobroma cacao* L.) menggunakan metode maserasi dan *Ultrasound-Assisted Extraction* menghasilkan profil senyawa yang berbeda berdasarkan analisis GC-MS. Maserasi menghasilkan jumlah senyawa lebih banyak (58 senyawa) dibandingkan UAE (26 senyawa), menunjukkan bahwa metode ekstraksi memengaruhi jenis dan jumlah senyawa yang terekstraksi. Meskipun demikian, kedua ekstrak menunjukkan aktivitas antioksidan dan antibakteri yang relatif lemah serta tidak berbeda signifikan secara statistik. Hal ini diduga disebabkan oleh rendahnya konsentrasi senyawa bioaktif yang berperan sebagai antioksidan dan antibakteri, serta keterbatasan penetrasi senyawa terhadap bakteri Gram-negatif seperti *Klebsiella pneumoniae*. Secara umum, metode maserasi cenderung lebih efektif dalam mengekstraksi senyawa berpotensi bioaktif. Pemilihan metode ekstraksi yang tepat dapat disesuaikan dengan kebutuhan aplikasi praktis, seperti pemanfaatan limbah kakao atau pengembangan produk kesehatan berbasis bahan alam.

Keterbatasan penelitian ini antara lain tidak dilakukannya proses fraksinasi untuk memisahkan senyawa bioaktif utama serta belum adanya

optimasi parameter ekstraksi seperti waktu, suhu, dan rasio pelarut terhadap bahan.

Oleh karena itu, penelitian selanjutnya disarankan untuk melakukan optimasi kondisi ekstraksi, penggunaan pelarut dengan variasi tingkat kepolaran, serta fraksinasi ekstrak untuk memperoleh senyawa yang lebih spesifik dan berpotensi meningkatkan aktivitas antioksidan maupun antibakteri.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada seluruh dosen pembimbing atas arahan, bimbingan, dan masukan yang diberikan selama pelaksanaan penelitian ini. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada seluruh staf dan laboran di laboratorium khususnya Laboratorium Kimia Farmasi Analisis, Universitas Lampung yang terlibat atas bantuan, fasilitas, dan dukungan teknis sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Solimah, Wahyunindarsih, Ucik Mawarsari, Dwi Susilo, Gusmiati, Andy Yusuf Kurniawan, et al. Statistik Kakao Indonesia 2023. Emak [Internet]. 2024;8:1-76. Available from: <https://www.bps.go.id/id/publication/2024/11/29/ed255af0c9059f2>

- 88fb7e1de/statistik-kakao indonesia-2023.
2. Kamelia M, Fathurohman F. Pemanfaatan Kulit Buah Kakao Fermentasi Sebagai Alternatif Bahan Pakan Nabati Serta Pengaruhnya Terhadap Pertumbuhan Ternak Entok (*Cairina muschata*). *Biosfer: Jurnal Tadris Biologi*. 2017;8(1):66–77.
 3. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International journal of BIomedical science REVIEW*. 2020;4(2):33–48.
 4. Fakriah., Eka Kurniasih, Adriana, Rusydi. Sosialisasi Bahaya Radikal Bebas Dan Fungsi Antioksidan Alami Bagi Kesehatan. *Jurnal Vokasi*. 2019;3(1):1–7.
 5. Yahya M, Ginting B, Saidi N. In-vitro screenings for biological and antioxidant activities of water extract from theobroma cacao l. Pod husk: Potential utilization in foods. *Molecules*. 2021;26(22).
 6. Tarina NTI, Kusuma SAF. Deteksi Bakteri *Klebsiella pneumonia*. *Farmaka [Internet]*. 2023;15(2):119–26. Available from: <http://jurnal.unpad.ac.id/farmaka/article/view/13173>
 7. Raja Merlinda Veronica, Dani Rosdiana, Anwar Bet, Agustiawan. Pengaruh Extended-Spectrum Beta-Lactamase (Esbl) Terhadap Mortalitas Pasien Pneumonia. *Ibnu Sina: Jurnal Kedokteran dan Kesehatan - Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sumatera Utara*. 2025;24(1):68–75.
 8. Vinca DT, Iqbal M, Triyandi R, Oktarlina RZ. Artikel Review: Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Kelor (*Moringa Oleifera*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Medical Profession Journal of Lampung*. 2023;13(4):649–54.
 9. Lestari HD, Asri MT. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*) Terhadap *Staphylococcus epidermidis*. *LenteraBio : Berkala Ilmiah Biologi*. 2021;10(3):302–8.
 10. Adha SD, Ibrahim M. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*) terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes*. *LenteraBio : Berkala Ilmiah Biologi*. 2021;10(2):140–5.
 11. Purwanti A, Agustin DB, Nuri N. Uji Potensi Antibakteri *Streptococcus mutans* Ekstrak Kulit Biji Kakao (*Theobroma cacao L.*) dengan Metode Ekstraksi Sonikasi. *Jurnal Farmasi Higea*. 2023;15(1):64.
 12. Ghanimi R, Ouhammou A, El Atki Y, El Hassan Bouchari M, Cherkaoui M. The Antioxidant Activities of Ethanolic, Methanolic, Ethyl Acetate, and Aqueous Extracts of the Endemic Species, *Lavandula mairei* Humbert (A Comparative Study between Cold and Hot Extraction). *Ethiopian journal of health sciences*. 2022;32(6):1231–6.
 13. Aprila Fajrin F, Holiday D, Nurhidayah H, Suci Wulansari P, Pudji Restanto D, Azkiyah L, et al. The ethanol extract of cocoa pod husk minimizes hyperalgesia and blood glucose levels in

- diabetic neuropathy model through transient receptor protein vanilloid (TRPV)-1. *Saudi Pharmaceutical Journal* [Internet]. 2024;32(6):102097. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2024.102097>
14. Md Yusof AH, Abd Gani SS, Zaidan UH, Halmi MIE, Zainudin BH. Optimization of an Ultrasound-Assisted Extraction Condition for Flavonoid Compounds from Cocoa Shells (*Theobroma cacao*) Using Response Surface Methodology. *Molecules* (Basel, Switzerland). 2019;24(4):1–16.
 15. Oñate-Gutiérrez JA, Díaz-Sánchez LM, Urbina DL, Pinzón JR, Blanco-Tirado C, Combariza MY. Exploring the chemical composition and coloring qualities of cacao fruit epicarp extracts. *RSC Advances*. 2023;13(19):12712–22.
 16. Harbone JB. *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis* (3rd ed.). Vol. 21. Chapman & Hall; 1998. 849 p.
 17. Simanjuntak SB, Suoth E, Fatimawali. Analisis Gas Chromatography-Mass Spectrometry Ekstrak N-Heksan Dari Daun Gedi Hijau (*Abelmoschus manihot* (L.) Medik). *Pharmacon*. 2021;10(4):1109–14.
 18. Konda JP, Siampa JP, Tallei TE, Kepel BJ, Fatimawali F. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Biji Langsung (*Lansium domesticum* var. *pubescens*) dan Duku (*Lansium domesticum* var. *domesticum*) dengan Metode DPPH. *Jurnal Ilmiah Sains*. 2020;20(2):113.
 19. Rachmawati S, Tasanif S, Roskiana Ahmad A, Handayani S. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Dengan Menggunakan Metode DPPH. *Makassar Natural Product Journal* [Internet]. 2023;1(4):2023–222. Available from: <https://journal.farmasi.umi.ac.id/index.php/mnpj>
 20. Rahmawati A, Irfan N, Amalia ET, Farmasi P, Mipa F, Muhammadiyah U. Pengujian Konsentrasi Hambat Minimum Ekstrak Etanol Bunga Telang (*Clitoria Ternatea* L.) Terhadap Bakteri *Klebsiella Pneumoniae*. 2025;2(2):75–87.
 21. Wulandari D, Asih J. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Suruhan (*Peperomia pellucida* L. Kunth) terhadap *Klebsiella pneumoniae* Antibacterial Activity of Suruhan Leaf Extract (*Peperomia pellucida* L. Kunth) against *Klebsiella pneumoniae*. 2017;15(1):33–9.
 22. Kurama GM, Maarisit W, Karundeng EZ, Potalangi NO. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Benalu Langsung (*Dendrophoe* sp) Terhadap Bakteri *Klebsiella Pneumoniae*. *Biofarmasetikal Tropis*. 2020;3(2):27–33.
 23. Pavlović N, Jokić S, Jakovljević M, Blažić M, Molnar M. Green extraction methods for active compounds from food waste - Cocoa bean shell. *Foods*. 2020;9(2):1–14.
 24. Yuliantari NWA, Widarta IWR, Permana IDGM. Pengaruh Suhu

- dan Waktu Ekstraksi Terhadap Kandungan Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Daun Sirsak (*Annona muricata* L .) Menggunakan Ultrasonik. Media Ilmiah Teknologi Pangan (Scientific Journal of Food Technology). 2017;4(1):35–42.
25. Andriani M, Permana IDGM, Widarta IWR. Pengaruh Suhu Dan Waktu Ekstraksi Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa Bilimbi* L .) Terhadap Aktivitas Antioksidan Dengan Metode Ultrasonic Assisted Extraction (UAE). Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan. 2019;8(3):330–40.
 26. Parbuntari H, Prestica Y, Gunawan R, Nurman MN, Adella F. Preliminary Phytochemical Screening (Qualitative Analysis) of Cacao Leaves (*Theobroma Cacao* L .). EKSAKTA. 2018;19(2).
 27. Sasikala V, Pingali M, Mohan RSVB, Vangalapati M. Extraction of Effective Phytochemical- Saponin From Herbal Plant *Tribulus Terristris*. International Journal of Engineering Research & Technology (IJERT). 2018;7(12):232–7.
 28. Kamarudin NA, Muhamad N, Nur N, Nik H, Tan SC. Impact of Solvent Selection on Phytochemical Content , Recovery of Tannin and Antioxidant Activity of *Quercus Infectoria* Galls. Pharmacognosy Journal. 2021;13(5):1195–204.
 29. Dian Arista S, Tukiran. Uji SKRINING FITOKIMIA EKSTRAK METANOL KULIT BATANG TUMBUHAN KLAMPOK WATU (*Syzygium litorale*) PHYTOCHEMICAL SCREENING ON METHANOL EKSTRAK FROM STEAM BARK KLAMPOK WATU (*Syzygium litorale*) Dian Arista Setiabudi * and Tukiran Departement of Chemistry , F. UNESA Journal of Chemistry. 2017;6(3).
 30. Rachmawati PA, Novita D, Rizqiyyah FN, Constanty IC, Prastika RA. BIODEGRADABLE DETERGEN DARI SAPONIN DAUN WARU DAN EKSTRAKSI BUNGA TANJUNG. INDONESIAN CHEMISRY AND APPLICATION JOURNAL. 2018;2(2):1–4.
 31. Aboagye D, Quaye KO, Akambase E, Bandoh CO, Issaka SS, Azaanang HCS bawiera, et al. Cholesterol Estimation in Edible Oils on the Ghanaian Market. American Journal of Food Science and Technology. 2024;12(3):77–81.
 32. Ibrahim NH, Mahmud MS, Said N. Microwave-assisted extraction of β -sitosterol from cocoa shell waste Microwave-assisted extraction of β -sitosterol from cocoa shell waste. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. 2020;
 33. Azevedo LS, Gonçalves TPR, Coimbra MC, Siqueira EP De, Alves N, Luciana AR, et al. Larvicidal potential of ether extract , and its derivatives fatty acids , and fatty acid methyl esters from *Tecoma stans* seeds : Bioprospecting for an effective insecticide. 2024;10(April):1–5.
 34. Ahmad J, Bagheri R, Bashir H, Baig MA, Al-huqail A, Ibrahim

- MM, et al. Organ-Specific Phytochemical Profiling and Antioxidant Analysis of *Parthenium hysterophorus* L. 2018;2018:1–10.
35. Amalia R, Anggarani MA. Bawang Bombai (*Allium Cepa* L.) Analysis Of Phenolic, Flavonoid Content And Antioxidant Activities Of Onion Bulb (*Allium Cepa* L.). *UNESA Journal of Chemistry* Vol. 2022;11(1):34–45.
36. Firdausia RS, Pratama NP, Kurniawati E, Ervany I, Irawan D. Optimasi Waktu Ekstraksi Dengan Metode Ultrasound Assisted Extraction (UAE) Terhadap Kandungan Senyawa Flavonoid dan Fenolik Daun Kayu Bulan (*Pisonia alba* Span.). *Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia*. 2025;11(1):274–80.
37. Endrini S, Rahmat A, Ismail P. Cytotoxic effect of γ -sitosterol from *Kejibeling* (*Strobilanthes crispus*) and its mechanism of action towards c-myc gene expression and apoptotic pathway. 2014;0–5.
38. Farooq M, Abutaha N, Mahboob S, Baabbad A, Almoutiri ND, Ahmed M, et al. Saudi Journal of Biological Sciences Investigating the antiangiogenic potential of *Rumex vesicarius* (humeidh), anticancer activity in cancer cell lines and assessment of developmental toxicity in zebrafish embryos. *Saudi Journal of Biological Sciences* [Internet]. 2020;27(2):611–22. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.11.042>
39. Hadi S, Subekti A. Uji Antioksidan dan Penetapan Flavonoid (*Nephrolepis cordifolia* (L) C. Presl). *Indonesian Journal Of Chemical Analysis*. 2023;06(01):1–9.
40. Skrovankova S, Mlcek J. Antioxidant Potential and Its Changes Caused by Various Factors in Lesser-Known Medicinal and Aromatic Plants. *Horticulturae*. 2025;11(104).
41. Anggraito YU, Susanti R, Iswari RS, Yuniastuti A, Lisdiana, WH N, et al. *Metabolit Sekunder Dari Tanaman; Aplikasi Dan Produksi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang. 2018. Hlm. 25-28.
42. Julianto TS. *Fitokimia Tinjauan Metabolit Sekunder dan Skrining fitokimia*. Vol. 53, Jakarta penerbit buku kedokteran EGC. 2019. 1–116 p.
43. Guamán-balcázar MC, Hualpa D, Infante G, Luzuriaga L, Riofrío JL, Jarro A, et al. Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of *Piper carpunya* and *Simira ecuadorensis*: A Comparative Study of Four Extraction Methods. *Plants*. 2025;14(2526):1–25.
44. Younes KM, Romeilah RM, El-HS, Moll HEL, Rajendrasozhan S, El-shemy HA, et al. In-vitro evaluation of antioxidant and antiradical potential of successive extracts, semi-purified fractions and biosynthesized silver nanoparticles of *Rumex vesicarius*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 2021;49(1):1–23.
45. Topraksever N, Artuç GÖ. Quantitative Determination of α -Tocopherol and α -Tocophery

- Acetate in Pharmaceutical and Supplementary Soft Capsules by High Performance Liquid Chromatography. Istanbul Gelisim University Journal of Health Sciences. 2025;26:500–11.
46. Achou CG, Díez MJC, Cano JD. Evaluation of Different Nutritional Sources in Lactic Acid Bacteria Fermentation for Sustainable Postbiotic Production. *Foods*. 2025;14(649):1–17.
47. Ge Y, Li D, Wang N, Shi Y, Guo G, Fang L, et al. Unveiling the fructose metabolism system in *Staphylococcus aureus*: insights into the regulatory role of FruR and the FruRKT operon in bacterial fitness. *BMC Microbiology*. 2024;24(13):1–12.
48. Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2016;80(3).
49. Setiawan A, Dwi A, Widodo W, Dwi P. Comparison of ciprofloxacin , cotrimoxazole , and doxycycline on *Klebsiella pneumoniae*: Time-kill curve analysis. *Annals of Medicine and Surgery [Internet]*. 2022;84(September):104841. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2022.104841>
50. Shariati A, Arshadi M, Khosrojerdi MA. The resistance mechanisms of bacteria against ciprofloxacin and new approaches for enhancing the efficacy of this antibiotic. *Public Health*. 2022; 85.