EFEK SENYAWA POLIFENOL EKSTRAK BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L) TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Lactobacillus acidophilus*

SKRIPSI

Oleh

Mega Nawaekasari

NIM 081610101068

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS JEMBER

2012

EFEK SENYAWA POLIFENOL EKSTRAK BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L) TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Lactobacillus acidophilus*

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Gigi pada
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Oleh

Mega Nawaekasari

NIM. 081610101068

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS JEMBER

2012

PERSEMBAHAN

Sebuah ungkapan rasa terima kasihku kepada
Allah SWT, Raja Kehidupan
Nabi Muhammad SAW, Sang Penyempurna Akhlak
Ayahanda dan Ibunda, darah dan keringatnya ada ditubuhku
Kakak dan Adikku, senyumanmu penyemangatku
serta Almamaterku

MOTTO

"Bacalah dengan nama Tuhanmu yang menciptakan. Dia telah menciptakan manusia dari segumpal darah. Bacalah, dan Tuhanmulah Yang Maha Pemurah. Yang mengajar dengan **Qalam**. Dialah yang mengajar manusia segala yang belum diketahui"

(Q.S Al-Alaq: 1-5)*)

"Dan cukuplah Rabb-mu menjadi Pemberi Petunjuk dan Penolong"

(Q.S Al-Furqan: 31)*)

Kehidupan tidak akan pernah memberikan kesempatan untuk segala sesuatu. Jika ingin mendapatkan kesempatan untuk melakukan sesuatu, Anda harus menciptakan sendiri kesempatan itu.

(Charles Buxton) **)

*) Departemen Agama Republik Indonesia. 2005. *AL-JUMANATUL 'ALI Al-Quran dan Terjemahannya*. Bandung: CV Penerbit J-ART

**) Zainudin, A. 2010. *Man Jadda Wajada The Art of Excellent Life*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Mega Nawaekasari

NIM : 081610101068

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul "Efek Senyawa Polifenol Ekstrak Biji Kakao (*Theobroma cacao* L) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Lactobacillus acidophilus*" adalah benar – benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan hasil karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 25 Januari 2012

Yang menyatakan,

Mega Nawaekasari

NIM. 081610101068

SKRIPSI

EFEK SENYAWA POLIFENOL EKSTRAK BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L) TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Lactobacillus acidophilus*

Oleh
Mega Nawaekasari
NIM. 081610101068

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : drg. Depi Praharani, M. Kes.

Dosen Pembimbing Anggota : drg. Tantin Ermawati, M. Kes.

PENGESAHAN

Skripsi Efek Senyawa Polifenol Ekstrak Biji Kakao (*Theobroma cacao* L) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Lactobacillus acidophilus* telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada :

hari, tanggal : Rabu, 25 Januari 2012

tempat : Ruang Sidang Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Tim Penguji

Ketua

drg. Depi Praharani, M.Kes.
NIP 19680122 199702 2 001

Anggota

drg. Tantin Ermawati, M. Kes.
NIP 19800322 200812 2 003

Sekretaris

drg. Melok Aris W., M. Kes, Sp. Perio
NIP 19710409 200501 2 002

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Jember

drg. Hj. Herniyati, M. Kes.
NIP 19590906 198503 2 001

RINGKASAN

Efek Senyawa Polifenol Ekstrak Biji Kakao (*Theobroma cacao* L) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Lactobacillus acidophilus*; Mega Nawaekasari, 081610101068; 2012; 50 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Kesehatan gigi dan mulut merupakan masalah yang penting dan perlu diperhatikan. Permasalahan kesehatan gigi dan mulut yang paling sering terjadi adalah karies dan penyakit periodontal. Karies gigi banyak terdapat di seluruh dunia, tanpa memandang umur, bangsa ataupun keadaan ekonomi. Salah satu faktor penyebab karies gigi adalah mikroorganisme terutama bakteri *Streptococcus mutans* dan *Lactobacillus acidophilus*. Alternatif dalam mengendalikan mikroorganisme tersebut adalah penggunaan tanaman yang memiliki khasiat antibakteri. Alasan dari pemakaian tanaman sebagai obat adalah karena pengobatan dengan cara tersebut cukup aman, efektif dan murah. Salah satu tanaman di Indonesia yang berpotensi sebagai tanaman obat adalah tanaman kakao (*Theobroma cacao* L). Kakao memiliki banyak manfaat dalam bidang kesehatan karena biji kakao kaya akan komponen senyawa polifenol seperti katekin, antosianin dan proantosianidin. Beberapa efek dari polifenol antara lain sebagai antimikroba, anti inflamasi, anti ulser, imunomodulator, efek anlgesik, anti trombosis, anti artherogenik. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek senyawa polifenol ekstrak biji kakao terhadap pertumbuhan bakteri *Lactobacillus acidophilus.*

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian *the post test only control group design*. Pada penelitian ini, digunakan tiga kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol negatif (*aquadest steril*), kelompok kontrol positif (obat kumur yang mengandung chlorhexidine 0,2%) dan kelompok senyawa polifenol ekstrak biji kakao. Jumlah sampel setiap kelompok

perlakuan adalah 12. Uji antibakteri menggunakan metode difusi sumuran dengan mengukur diameter zona hambat.

Hasil penelitian dilakukan uji statistik non parametrik Kruskall Wallis yang menunjukkan masing - masing kelompok perlakuan memiliki perbedaan diameter zona hambat yang signifikan. Kemudian dilanjutkan dengan uji Mann Whitney yang hasilnya menunjukkan bahwa diameter zona hambat antara kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif dan kelompok senyawa polifenol ekstrak biji kakao berbeda secara signifikan., dimana kelompok senyawa polifenol ekstrak biji kakao mempunyai diameter zona hambat yang paling besar.

Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa senyawa polifenol ekstrak biji kakao memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Lactobacillus acidophilus.*

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "Efek Senyawa Polifenol Ekstrak Biji Kakao (*Theobroma cacao* L) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Lactobacillus acidophilus*". Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada:

1. drg. Hj. Herniyati, M. Kes., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
2. drg. Depi Praharani, M. Kes., selaku Dosen Pembimbing Utama, dan drg. Tantin Ermawati, M. Kes., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah memberikan bimbingan dan saran dengan penuh kesabaran sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
3. drg. Melok Aris W., M. Kes, Sp. Perio, selaku Sekretaris Penguji yang telah memberikan saran demi kesempurnaan skripsi ini.
4. drg. Yuliana MDA, M.Kes., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberi motivasi, saran dan nasehat dalam perjalanan studi selama menjadi mahasiswa.
5. Seluruh staf dan teknisi Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, Setyo Pinardi, A.Md dan Indria Cahyani, A.Md.
6. Orang tua tercinta, Ayahanda H. Nyugihono, SE dan Ibunda Hj. Ernawati, terimakasih banyak atas do'a yang selalu tercurah selama ini, kasih sayang, motivasi dan pengorbanan yang selalu mengalir tiada batas.
7. Kakak dan Adikku (Nindyo Intan Sari dan Hanifah Chesia Fawwaz Majid), senyum kalian yang selalu menjadi penyemangatku.

8. Ghanif Agung R, terimakasih atas hari-hari kemarin, ini, dan semoga seterusnya, tawa dan airmata yang kamu buat telah menjadi salah satu bagian dari hidupku.
9. *Partner* penelitianku (Tri Mey P. dan Erwin Indra K.), terimakasih atas bantuan, semangat dan inspirasinya.
10. Sahabat-sahabatku Teteh, Neng, Mbed, Mbak Manik, Kiki, Lusi, Isti, Sischa, Ita, Widya, Aris, Deden, terimakasih atas do'a, semangat dan nasehatnya.
11. Para dosen yang telah membagi ilmunya kepadaku, setiap pertemuanku dengan kalian adalah limpahan rahmat dari-Nya.
12. Teman-teman FKG 2008 dan juga semua yang telah membantu kelancaran penyusunan skripsi ini, yang tidak bisa saya sebutkan satu-persatu. Terima kasih.

Penulis sadar masih banyak ketidaksempurnaan dan kekurangan dalam penulisan skripsi ini. Untuk itu, kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan demi kesempurnaan penulisan selanjutnya. Penulis berharap skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi kita semua. Amin.

Jember, Januari 2012

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL ..... **i**
HALAMAN PERSEMBAHAN ..... **ii**
HALAMAN MOTTO ..... **iii**
HALAMAN PERNYATAAN ..... **iv**
HALAMAN PEMBIMBINGAN ..... **v**
HALAMAN PENGESAHAN ..... **vi**
RINGKASAN ..... **vii**
PRAKATA ..... **ix**
DAFTAR ISI ..... **xi**
DAFTAR TABEL ..... **xiv**
DAFTAR GAMBAR ..... **xv**
DAFTAR LAMPIRAN ..... **xvi**
BAB 1. PENDAHULUAN **1**
1.1 Latar Belakang **1**
1.2 Rumusan masalah **2**
1.3 Tujuan Penelitian **2**
1.4 Manfaat Penelitian **3**
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA **4**
2.1 Tinjauan Umum Kakao **4**
2.1.1 Klasifikasi Kakao 4
2.1.2 Deskripsi Botani Kakao 5
2.1.3 Biji Kakao 7
2.2 Polifenol Kakao **9**
2.3 *Lactobacillus* **13**
2.3.1 Ciri-ciri Organisme 13

2.3.2 Isolasi dan Identifikasi 13
2.3.3 Klasifikasi 14
2.3.4 *Lactobacillus acidophilus* 14
2.4 Hipotesis 17
BAB 3. METODE PENELITIAN 18
3.1 Jenis Penelitian 18
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian 18
3.3 Identifikasi Penelitian 18
3.3.1 Variabel Penelitian 18
3.3.2 Definisi Operasional 19
3.4 Sampel Penelitian 19
3.4.1 Jumlah Sampel 19
3.4.2 Pengelompokan Sampel 19
3.5 Alat dan Bahan Penelitian 19
3.5.1 Alat-alat Penelitian 19
3.5.2 Bahan Penelitian 20
3.6 Prosedur Penelitian 20
3.6.1 Tahap Persiapan 20
3.6.2 Tahap Perlakuan 22
3.6.3 Tahap Pengukuran 23
3.6.4 Alur Penelitian 25
3.7 Analisis Data 25
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN 27
4.1 Hasil 27
4.2 Pembahasan 33
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN 36
5.1 Kesimpulan 36
5.2 Saran 36

DAFTAR PUSTAKA 37
LAMPIRAN 42

DAFTAR TABEL

Halaman

4.1 Hasil pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus* 29

4.2 Uji Kolmogorov-Smirnov 30

4.3 Uji Levene 31

4.4 Uji Kruskal Wallis 32

4.5 Uji Mann Whitney 32

DAFTAR GAMBAR

Halaman

2.1 Biji kakao 6
2.2 Tanaman kakao 7
2.3 Struktur kimia senyawa polifenol yang umum terdapat dalam kakao 10
2.4 Struktur kimia katekin 11
2.5 Struktur kimia flavonoid 12
2.6 Struktur kimia tanin 12
2.7 *Lactobacillus acidophilus* dilihat dengan mikroskop *scanning electron* Theralac 16
2.8 Koloni *Lactobacillus acidophilus* 17
3.1 Pengukuran diameter zona hambat 24
4.1 Identifikasi *Lactobacillus acidophilus* dilihat dengan mikroskop cahaya pembesaran 1000x 27
4.2 Diameter zona hambat terhadap pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus* 28
4.3 Histogram rata-rata diameter zona hambat pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus* 30

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

A. Penghitungan besar sampel penelitian 42
B. Kriteria sampel biji kakao 43
C. Prosedur pembuatan senyawa polifenol ekstrak biji kakao 44
D. Hasil penelitian..... 45
E. Analisis data 46
F. Foto alat dan bahan penelitian 49

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kesehatan gigi dan mulut merupakan masalah yang penting dan perlu diperhatikan. Permasalahan kesehatan gigi dan mulut yang paling sering terjadi adalah karies dan penyakit periodontal (Kurniawati, 2007:16). Karies gigi banyak terdapat di seluruh dunia, tanpa memandang umur, bangsa ataupun keadaan ekonomi. Menurut penelitian di negara Eropa, Amerika dan Asia termasuk Indonesia, ternyata 80 – 95 % dari anak di bawah umur 18 tahun terserang karies gigi (Tarigan, 1995:1).

Karies gigi merupakan suatu penyakit jaringan keras gigi yaitu email, dentin dan sementum yang disebabkan oleh aktivitas mikroorganisme dalam suatu karbohidrat yang dapat diragikan (Kidd dan Bechal, 1992:1). Peneliti terdahulu mengidentifikasikan mikroorganisme spesifik penyebab karies gigi adalah *Streptococcus mutans* dan *Lactobacillus acidophilus* (Herdiyati, 2007:2). Bakteri tersebut mampu mengubah glukosa dan karbohidrat pada makanan menjadi asam melalui proses fermentasi (Pratiwi, 2007:25). Asam yang terbentuk dapat melunakkan bagian terkeras gigi yaitu email (Pratiwi, 2007:25 dan Tarigan, 1992:21). Bila lapisan email telah rusak maka bakteri dapat masuk ke lapisan yang lebih dalam yaitu dentin. Jika tidak dirawat, proses ini akan terus berjalan sehingga lubang semakin dalam (Pratiwi, 2007:25).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Streptococcus mutans* berperan dalam permulaan (*initial*) terjadinya karies, sedangkan *Lactobacillus sp* berperan dalam proses perkembangan dan kelanjutan karies (Soesilo *et al*, 2005:26). Ada banyak spesies *Lactobacillus sp* yang teridentifikasi pada saliva dari subyek yang karies, namun yang terbanyak yaitu *Lactobacillus acidophilus* (Munoz-Jeldrez *et al* dalam Badet dan Thebaud, 2008:40).

Salah satu alternatif dalam mengendalikan mikroorganisme ini adalah penggunaan tanaman yang memiliki khasiat antibakteri. Penggunaan tanaman obat saat ini sudah cukup populer. Indonesia memiliki sekitar 30 ribu jenis tanaman. Seribu jenis di antaranya diketahui memiliki khasiat obat. Sementara, 400 jenis dari 1000 jenis tersebut telah digunakan untuk produksi obat tradisional dalam negeri (LIPI (2005) dalam Yuniaswan, 2010:3). Alasan dari pemakaian tanaman sebagai obat adalah karena pengobatan dengan cara tersebut cukup aman, efektif dan murah (Devitt (2002) dalam Yuniaswan, 2010:3).

Salah satu tanaman di Indonesia yang berpotensi sebagai tanaman obat adalah tanaman kakao (*Theobroma cacao* L). Selama ini tanaman kakao hanya dikenal sebagai bahan dasar untuk membuat cokelat dan banyak orang yang menganggap cokelat merupakan makanan kariogenik yaitu makanan yang dapat menyebabkan karies (Budisuari *et al*, 2010:88). Padahal kakao memiliki banyak manfaat dalam bidang kesehatan karena biji kakao kaya akan komponen senyawa polifenol seperti katekin, antosianin dan proantosianidin. Beberapa efek dari polifenol antara lain sebagai anti artherogenik, anti ulser, anti trombosis, anti inflamasi, imunomodulator, antimikroba, vasodilator, efek analgesik (Hii *et al*, 2009:703).

Berdasarkan uraian di atas, maka penulis berkeinginan melakukan penelitian tentang kemampuan senyawa polifenol ekstrak biji kakao dalam menghambat pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus* yang merupakan bakteri kariogenik.

1.2 Rumusan Masalah

Permasalahan yang dapat dirumuskan yaitu apakah senyawa polifenol ekstrak biji kakao mempunyai efek terhadap pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus*.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui efek senyawa polifenol ekstrak biji kakao terhadap pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus.*

1.4 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang dapat diambil dari penelitian ini adalah:

1. Memberikan informasi bagi masyarakat mengenai daya antibakteri senyawa polifenol ekstrak biji kakao terhadap *Lactobacillus acidophilus.*
2. Memberikan alternatif bahan alami yang bersifat antimikroba terutama terhadap bakteri patogen penyebab penyakit gigi dan mulut.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Umum Kakao (*Theobroma cacao* L)

Tanaman kakao berasal dari daerah hutan tropis hulu sungai Amazon. Berarti tanaman kakao hidup pada hutan hujan tropis yang terlindung di bawah pohon besar, suhu tidak terlalu tinggi, kelembapan cukup, dan angin tidak terlalu kencang (Susanto, 1994:61).

2.1.1 Klasifikasi Kakao

Dalam taksonomi, kakao diklasifikasikan sebagai berikut.

Kingdom : *Plantae*
Divisio : *Spermatophyta*
Subdivisio : *Angiospermae*
Kelas : *Dicotyledoneae*
Ordo : *Malvales/Columniferae*
Famili : *Sterculiaceae*
Genus : *Theobroma*
Spesies : *Theobroma cacao* L (Tjitrosoepomo, 2007:269-274)

Varietas jenis kakao secara garis besar dapat dibagi menjadi dua tipe besar, yaitu :

a. Criollo

Criollo termasuk kakao yang bermutu tinggi atau kakao mulia atau *odel cacao* atau *fine flavour cacao* (Susanto, 1994:21). Negara-negara penghasil kakao ini adalah Venezuela, Ekuador, Trinidad, Grenada, Srilangka, Indonesia, Samoa, Jamaica, Suriname, dan sebagian kecil India Barat (Sunanto, 1992:13).

b. Forastero

Forastero umumnya termasuk kakao bermutu rendah atau disebut kakao curah atau kakao curai atau *bulk cacao* (Susanto, 1994:21). Jenis kakao ini berasal dari Bahai (Brazil), Amelonado (Afrika Barat) dan Ekuador. Jenis Forastero dikenal sebagai penghasil biji kakao lindak. Kakao lindak merupakan kakao kualitas kedua dan digunakan sebagai bahan komplementer (pelengkap) dalam mengolah kakao mulia. Meskipun termasuk kualitas kedua dan digunakan sebagai bahan komplementer, kakao lindak mendominasi seluruh perkebunan kakao di Indonesia (Sunanto, 1992:14).

2.1.2 Deskripsi Botani Kakao

a. Biji

Kakao termasuk tanaman kauliflori yang artinya bunga dan buah tumbuh pada batang dan cabang tanaman. Dalam setiap buah terdapat sekitar 20-50 butir biji. Biji dibungkus oleh daging buah atau *pulp* yang berwarna putih dan rasanya manis (Gambar 2.1). Biji kakao terdiri dari kulit biji, dua kotiledon yang saling melipat dan embrio yang terdiri dari epikotil, hipokotil, dan radikula (Susanto, 1994:25).

b. Akar

Tanaman kakao yang berasal dari biji (generatif) memiliki akar tunggang yang tumbuh lurus kebawah. Akar lateral pada awal pertumbuhan tumbuh pada leher akar yang tidak jauh dari permukaan tanah. Sedangkan pada tanaman dewasa akar sekunder menyebar sekitar 15-20 cm di bawah permukaan tanah (Sunanto, 1992:16).

Tanaman yang berasal dari stek dan cangkok tidak mempunyai akar tunggang, namun akan berkembang 2-3 buah akar yang berfungsi seperti akar tunggang sehingga tanaman dapat tegak dan kuat (Sunanto, 1992:16).

Gambar 2.1 Biji kakao (Rusdin, 2011)

c. Batang dan cabang

Percabangan tanaman kakao menunjukkan ciri yang khas (spesifik). Tanaman kakao yang berasal dari biji (generatif), akan tumbuh tanaman kakao muda yang memiliki batang lurus. Tetapi pada umur sekitar 10 bulan, pada batang akan terbentuk 3-6 cabang kipas (*fan branches*). Titik pertemuan cabang tersebut disebut prapatan (*jorquette*). Tinggi batang sampai terbentuk *jorquette* sangat bervariasi, tetapi pada umumnya sekitar 1-2 meter dari permukaan tanah (Gambar 2.2) (Sunanto, 1992:16).

Tanaman kakao mempunyai percabangan yang bersifat *dimorphous* (2 tipe percabangan). Cabang yang selamanya tumbuh vertikal disebut *orthotroph,* dan cabang yang selalu tumbuh horizontal disebut *plagiotroph* (Sunanto, 1992:17).

d. Daun

Karena percabangan tanaman kakao bersifat *dimorphous* maka kedudukan daunnya juga bersifat *dimorphous*. Daun pertama mempunyai tangkai daun (*petiol*) yang panjang dan simetris, dan *petiol* tersebut pada ujungnya membengkok. Daun pada cabang kipas, *petiol*nya lebih pendek dan kurang simetris (Gambar 2.2) (Sunanto, 1992:18).

e. Bunga

Tanaman kakao berbunga sepanjang tahun dan tumbuh secara berkelompok pada bantalan bunga yang menempel pada batang tua, cabang dan ranting. Satu bantalan yang baik dapat mengeluarkan bunga yang jumlahnya cukup banyak (Sunanto, 1992:19).

f. Buah

Warna buah kakao beraneka ragam, namun pada dasarnya hanya ada dua macam yaitu buah muda berwarna hijau putih dan bila masak menjadi berwarna kuning dan buah muda yang berwarna merah setelah masak menjadi jingga (Gambar 2.2) (Susanto, 1994:33).

Gambar 2.2 Tanaman kakao (Rusdin, 2011)

2.1.3 Biji Kakao

Selama proses pengolahan, biji kakao akan mengalami perubahan fisik, kimiawi, dan biologis. Proses pengolahan untuk biji kakao ada 2 cara

pengeringan, yakni pengeringan yang didahului dengan proses fermentasi dan pengeringan yang tidak didahului proses fermentasi. Fermentasi merupakan suatu proses produksi suatu produk dengan mikroba sebagai organisme pemroses yang bertujuan untuk memperbaiki dan membentuk citra rasa khas kakao serta mengurangi rasa pahit dalam biji (Departemen Perindustrian, 2007:9).

a. Kandungan Gizi Biji Kakao

Biji kakao mempunyai kandungan lemak nabati tinggi, sekitar 50 %. Lemak biji kakao terdiri dari tujuh macam asam lemak, asam palmitat 24,8 %, asam stearat 33,0%, asam oleat 3,2%, asam arakhidonat 0,8%, asam palmitoleat 0,3%, dan asam miristat 0,2%. Kadar dari asam lemak tersebut beragam dan ditentukan oleh jenis tanaman, lokasi, jenis tanah, dan musim pembuahan. Proses fermentasi juga dapat menurunkan kadar bahan bukan lemak, sehingga secara relatif kadar lemak akan meningkat (Susanto, 1994:176).

Kandungan karbohidrat biji kakao sekitar 15 %, terdiri dari 6% pati, 1% gula, dan lainnya berupa *pectin*, lender, dan getah. Selama proses fermentasi karbohidrat dihidrolisis menghasilkan gula reduksi. Kandungan nitrogen (N) dalam biji kakao sekitar 3,5 % (Susanto, 1994:175-176).

Biji kakao mengandung polifenol yaitu senyawa yang sangat pahit yang terdiri dari antosianin dan leukoantosianin (3%), kathekin (3%) dan polifenol komplek (Susanto, 1994:175-176). Menurut Jardine (1999), kandungan polifenol dan asam fenolik dalam biji kakao kering tanpa fermentasi sekitar 14%. Pada biji kakao kering dengan fermentasi, kandungan polifenol berkurang sampai 90% (Ide, 2008:107). Selama proses fermentasi, polifenol teroksidase oleh polifenol oksidase membentuk quinon dan diquinon. Selama fermentasi serta pengeringan, kathekin dan epikathekin diproses dan menghasilkan warna coklat yang khas. Senyawa purin pada biji kakao yang menyebabkan rasa sangat pahit yaitu theobromin dan kafein. Kadar theobromin di dalam kotiledon sekitar 1,5% dan kafeinnya 0,15%. Theobromin tercuci dari kotiledon dan diendapkan dalam kulit biji selama proses fermentasi (Susanto, 1994:176).

b. Manfaat Biji Kakao

Dahulu kakao dipercaya sebagai makanan tinggi kalori untuk memompa energi misalnya bagi para atlet dan tentara. Banyak penelitian yang dilakukan tentang manfaat biji kakao dalam bidang kesehatan. Peneliti mengindikasikan bahwa beberapa komponen yang terkandung dalam kakao dapat membantu mencegah penyakit kardiovaskular dan dapat mengurangi resiko kanker (Departemen Perindustrian, 2007:12).

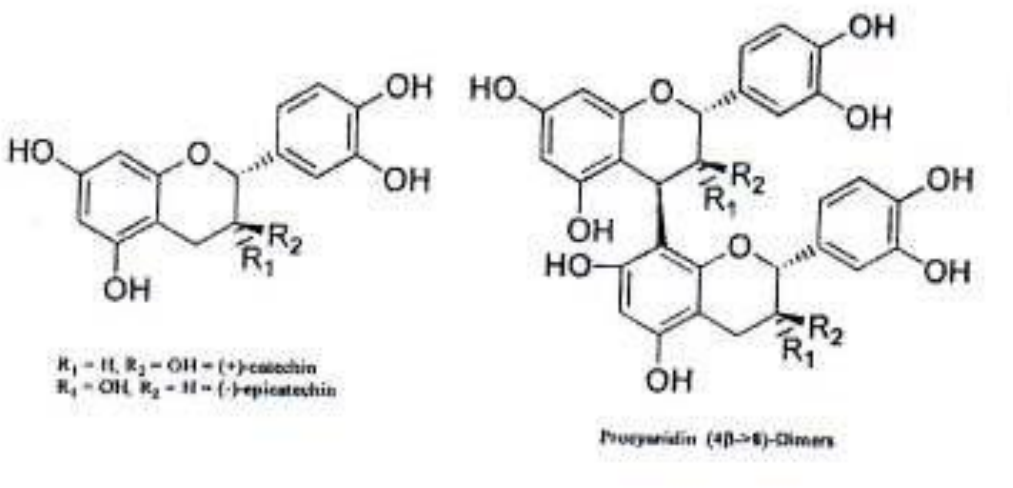
Biji kakao mempunyai potensi sebagai bahan antioksidan alami yakni mempunyai kemampuan untuk memodulasi sistem imun, anti artherogenik, anti ulser, anti trombosis, anti inflamasi, efek analgesik (Othman *et al* (2007); Weisburger (2001); Keen (2005) dalam Sartini *et al*, 2007:36 dan Hii *et al*, 2009:703). Selain itu kakao bersifat antimikroba terhadap beberapa bakteri patogen dan bakteri kariogenik (Osawa *et al* (2000); Bouchers (2002); Lamuela-Raventos (2005) dalam Sartini *et al*, 2007:36).

Havsteen (2002) menyatakan bahwa flavonoid yang terdapat dalam kakao merupakan suatu komponen alam yang diketahui memiliki efek farmakologik seperti antioksidatif, anti inflamasi dan anti diuretik serta memiliki kemampuan sebagai zat antimikroba (Pepeljnjak *et al*, 2005:431). Menurut Ulanowska *et al* (2006) mekanisme kerja flavonoid sebagai zat antibakteri masih belum diketahui secara lengkap. Namun dari beberapa hasil penelitian terkini menyatakan bahwa aktivitas antibakteri tersebut erat kaitannya dengan kemampuan flavonoid untuk menghambat sintesis DNA sel bakteri (Ulanowska *et al*, 2007:134-135).

2.2 Polifenol Kakao

Polifenol memiliki tanda khas yakni memiliki banyak gugus fenol dalam molekulnya (Gambar 2.3). Zat ini juga dikenal dengan nama *soluble tanin*, merupakan metabolit sekunder yang terdapat dalam daun, biji dan buah dari tumbuhan tingkat tinggi (Baxter *et al* (1997) dalam Misnawi *et al*, 2003a:104) dan bersifat antioksidan kuat. Polifenol secara alami dapat ditemukan dalam sayuran

(brokoli, kol, seledri), buah (apel, delima, melon, ceri, pir, dan stroberi), kacang (walnut, kedelai, kacang tanah), minyak zaitun, dan minuman (seperti teh, kopi, kakao dan anggur merah) (Erniati, 2007:6).



Gambar 2.3 Struktur kimia senyawa polifenol yang umum terdapat dalam kakao (Erniati, 2007:6)

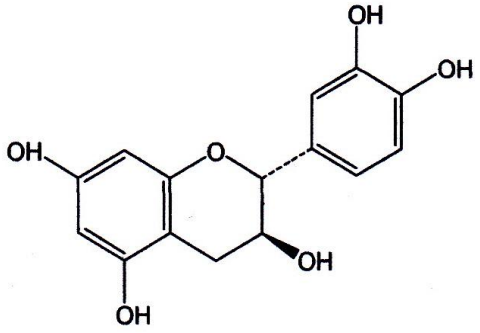
Lee *et al* (2003) dalam Erniati (2007:6) mengungkapkan bahwa kandungan polifenol total dalam kakao lebih tinggi dibandingkan dalam anggur maupun teh. Biji kakao yang berasal dari buah yang masih muda mengandung polifenol yang lebih kecil dibanding pada biji kakao dari buah kakao masak (Ide, 2008:13).

Polifenol dalam produk kakao bertanggung jawab atas pembentukan rasa pahit melalui mekanisme pengendapan protein-protein yang kaya prolin dalam air ludah dan menyumbang rasa pahit khas kakao bersama alkaloid, beberapa amino, peptida dan pirazin (Misnawi *et al*, 2003b:405).

Menurut Wollgast dan Anklam (2000) dalam Porbowaseso, 2005:7) polifenol kakao terutama adalah monomer dan oligomer dari flavan-3-ol sebagai komponen dasar. Mereka juga mengklasifikasikan polifenol kakao dalam tiga

kelompok yaitu katekin (flavan-3-ols) 37%, antosianin 4% dan proantosianidin 58%.

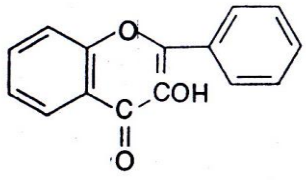
Katekin adalah senyawa polifenol alami, merupakan metabolit sekunder dan termasuk dalam penyusun golongan tanin. Katekin biasanya disebut juga asam *catechoat* dengan rumus kimia $C_{15}H_{14}O_6$, tidak berwarna dan dalam keadaan murni sedikit tidak larut dalam air dingin tetapi sangat larut dalam air panas, larut dalam alkohol dan *etil asetat*, hampir tidak larut dalam *koloroform*, *benzen* dan *eter*. Katekin merupakan isomer yang hidroksil-hidroksil pada cincin benzenanya berbentuk trans (Gambar 2.4) (Winarno, 1992:182); berkhasiat sebagai antibakteri, hemostasis, astringen dan antioksidan (Lestari, 2009:8).



Gambar 2.4 Struktur kimia katekin (Lucida *et al*, 2007:1)

Antosianin tergolong pigmen yang disebut flavonoid dan pada umumnya larut dalam air (Winarno (1997) dalam Rahmawati, 2011:6). Flavonoid merupakan golongan terbesar dari senyawa fenol (Harborne (1987) dalam Ibtisam, 2008:6). Senyawa ini terdapat pada semua bagian tumbuhan termasuk daun, akar, bunga, buah dan biji (Markham (1988) dalam Ibtisam, 2008:6). Flavonoid mengandung dua cincin benzena yang dihubungkan oleh tiga atom karbon (Gambar 2.5) (Winarno,1992:180). Flavonoid bertindak sebagai penangkal

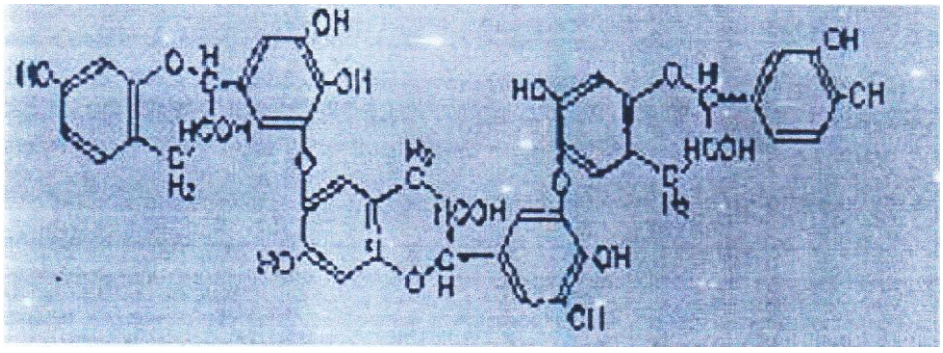
yang baik radikal bebas, menghambat reaksi hidrolisis dan oksidasi enzim, antibakteri, serta antiinflamasi (Frankel (1995); Pourmorad *et al* (2006); Khotimah (2004) dalam Ibtisam, 2008:7).



Flavonol

Gambar 2.5 Struktur kimia flavonoid (Winarno,1992:180)

Proantosianidin adalah nama lain dari tanin yang terkondensasi. Tanin merupakan senyawa fenolik kompleks. Tanin dibagi menjadi dua kelompok atas dasar tipe struktur dan aktivitasnya terhadap senyawa hidrolitik terutama asam yaitu tanin terkondensasi (*condensed tannin*) dan tanin yang dapat dihidrolisis (*hyrolyzable tannin*) (Naczk *et al* (1994) dan Hagerman *et al* (2002) dalam Pambayun *et al*, 2007:142). Rumus empiris tanin adalah $C_{14}H_{14}O_{11}$ (Gambar 2.6) (Subiarto dan Mirawaty, 2002:44).



Gambar 2.6 Struktur kimia tanin (Subiarto dan Mirawaty, 2002:44)

2.3 Lactobacillus

Lactobacillus sp adalah mikroorganisme yang muncul selama tahun pertama kehidupan anak dan hadir dengan jumlah yang tinggi dalam air liur, pada dorsum lidah, selaput lendir, palatum durum, plak gigi dan dalam jumlah yang lebih sedikit di permukaan gigi (Badet dan Thebaud, 2008:38). Pada keadaan normal, bakteri tersebut tidak menimbulkan penyakit (Tarigan, 1992:21).

2.3.1. Ciri – ciri Organisme

Lactobacillus sp merupakan batang Gram positif. Kelompok ini secara morfologi tidak homogen, ada yang berbentuk batang panjang, ada yang pendek dan ada juga yang berbentuk kokus, tetapi dari segi fisiologi dapat dikarakterisasi relatif baik. Bakteri ini tidak membentuk spora dan tidak bergerak (Schlegel dan Schmidt, 1994:314).

2.3.2 Isolasi dan Identifikasi

Lactobacillus sp tumbuh dalam keadaan anaerob, tetapi aerotoleran. Ciri khas lain dari *Lactobacillus sp* adalah kebutuhannya akan zat tambahan. Tidak satu pun spesiesnya dapat hidup pada medium mineral murni dengan glukosa dan amonium. *Lactobacillus sp* dibiakkan terutama pada media kompleks, yang mengandung ekstrak ragi, sari tomat, bahkan darah dalam jumlah yang besar (Schlegel dan Schmidt, 1994:314).

Teknik untuk mengidentifikasi spesies meliputi fermentasi karbohidrat, hidrolisis arginin dan aktivitas enzim. Tetapi karena metode biokimia tersebut tergantung pada lingkungan terkadang menyebabkan hasil ambigu atau bahkan kesalahan identifikasi (Nigatu *et al* (2000); Song *et al* (1999) dalam Méndez *et al*, 2009:10). Metode genotip dianggap lebih dapat diandalkan untuk tujuan identifikasi (Méndez *et al*, 2009:10). Menurut Badet dan Thebaud (2008:40) identifikasi yang tepat pada *Lactobacillus sp* dalam saliva pasien dengan karies

sulit ketika menggunakan metode biokimia. Dengan munculnya alat molekuler, identifikasi menjadi lebih mudah.

2.3.3 Klasifikasi

Menurut Schlegel dan Schmidt (1994:317), sifat khusus yang dimiliki *Lactobacillus sp* yaitu meragikan glukosa menjadi laktat saja atau menjadi produk peragian lain dan karbondioksida. Berdasarkan sifat tersebut *Lactobacillus sp* dibagi menjadi homofermentatif dan heterofermentatif.

2 Peragian asam laktat homofermentatif

Bakteri asam laktat homofermentatif membentuk laktat murni atau hampir (90%) murni. Bakteri ini menguraikan glukosa melalui alur fruktosa difosfat termasuk aldolase, dan memindahkan hidrogen yang terjadi pada dehidrogenasi gliserinaldehid-3-fosfat ke piruvat. Spesies dari homofermentatif adalah *Lactobacillus lactis, Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei* dan *Lactobacillus plantarum*.

3 Peragian asam laktat heterofermentatif

Bakteri asam laktat heterofermentatif tidak mempunyai enzim utama dari alur fruktosadifosfat yaitu aldolase dan triosafosfat isomerase. Penguraian glukosa dimulai melalui alur pentosa fosfat yaitu melalui glukosa-6-fosfat, 6-fosfoglukonat dan ribulosa-5-fosfat. Spesies dari heterofermentatif adalah *Lactobacillus fermentum, Lactobacillus brevis, Lactobacillus buchneri* dan *Lactobacillus viridescens*.

2.3.4 *Lactobacillus acidophilus*

Ada banyak spesies *Lactobacillus sp* yang teridentifikasi pada saliva dari subyek yang karies, namun yang terbanyak yaitu *Lactobacillus acidophilus* (Munoz-Jeldrez *et al* dalam Badet dan Thebaud, 2008:40).

Lactobacillus acidophilus dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom : *Bacteria*

Divisi : *Firmicutes*

Kelas : *Bacilli*

Ordo : *Lactobacillales*

Famili : *Lactobacillaceae*

Genus : *Lactobacillus*

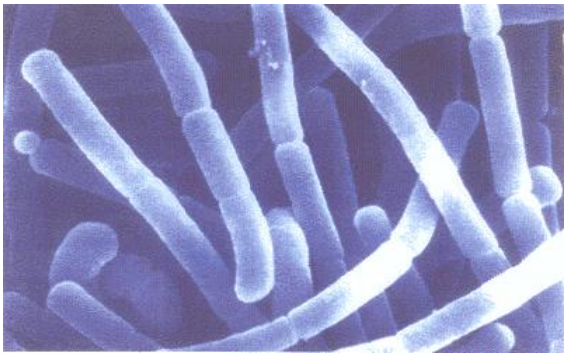
Spesies : *Lactobacillus acidophilus* (Ahumada *et al*, 2003:2).

a. Habitat

Lactobacillus acidophilus dapat melekat pada permukaan email baik secara langsung atau pun dengan saliva (Ahumada *et al*, 2003:2). Salah satu faktor yang dapat mempengaruhi laju *Lactobacillus acidophilus* pada saliva adalah asupan karbohidrat (Badet dan Thebaud, 2008:39). Beberapa penelitian menyatakan bahwa *Lactobacillus acidophilus* mampu bersaing dengan bakteri lain sehingga dapat tumbuh baik meskipun terdapat bakteri lainnya, hal ini disebabkan karena bakteri ini menghasilkan bakteriosin yang dapat membunuh bakteri lainnya (Percival (1997) dalam Méndez *et al*, 2009:14).

b. Karakteristik, kultur dan identifikasi

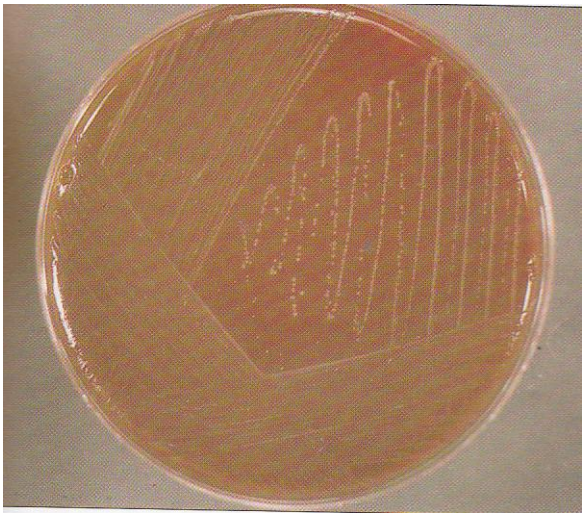
Lactobacillus acidophilus adalah salah satu dari delapan genera umum dari bakteri asam laktat. Tiap genus dan spesiesnya mempunyai karakteristik yang berbeda. Namun, secara umum mereka merupakan bakteri Gram positif dengan sel berbentuk batang panjang tetapi terkadang hampir bulat dan membentuk rantai yang pendek, berukuran 0,5-1,2 x 1,0-10,0 μm (Gambar 2.7), bersifat *non motil*, dan *non spora* yang memproduksi asam laktat sebagai produk utama dari metabolisme fermentasi dan menggunakan laktosa sebagai sumber karbon utama dalam memproduksi energi (Buttris, 1997:21).



Gambar 2.7 *Lactobacillus acidophilus* dilihat dengan mikroskop *scanning electron* Theralac (Aanonim, 2009)

Kultur *Lactobacillus acidophilus* dapat dilakukan pada media yang mengandung prebiotik (Rahayu dan Margino (1986); Sneath *et al* (1986) dalam Purwandhani dan Rahayu, 2003:68). Ciri-ciri koloni *Lactobacillus acidophilus* antara lain warna koloni putih susu atau agak krem, bentuk koloni bulat dengan tepian seperti wol (Gambar 2.8) (Buttris, 1997:21).

Identifikasi isolat *Lactobacillus acidophilus* didasarkan pada bentuk sel batang, pengecatan gram positif, *non motil,* katalase negatif, tidak membentuk dekstran, kemampuan pembentukan asam dari beberapa sumber karbon, kemampuan tumbuh dalam berbagai pH maupun suhu, model fermentasi glukosa (homofermentatif), tipe peptidoglikan pada dinding sel (Rahayu dan Margino (1986); Sneath *et al* (1986) dalam Purwandhani dan Rahayu, 2003:68).



Gambar 2.8 Koloni *Lactobacillus acidophilus* (Tony, 1997:111)

c. Patogenitas

Lactobacillus acidophilus memfermentasi karbohidrat dan menghasilkan asam organik sehingga mengubah pH rongga mulut menjadi asam. Asam yang terbentuk dapat melunakkan bagian terkeras gigi yaitu email gigi. Bila lapisan email telah rusak maka bakteri dapat masuk ke lapisan yang lebih dalam yaitu dentin. Proses ini akan terus berjalan sehingga lubang semakin dalam bila tidak dilakukan perawatan (Pratiwi, 2007:25).

2.4 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah senyawa polifenol ekstrak biji kakao (*Theobroma cacao* L) mempunyai efek terhadap *Lactobacillus acidophilus* yakni menghambat pertumbuhannya.

BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris. Keuntungan dari eksperimental laboratoris adalah pengaruh perlakuan lebih terkendali, terukur dan lebih dapat dipercaya. Adapun rancangan penelitian yang digunakan *the post test only control group design* (Notoatmojo, 2005:167).

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada bulan Juli - Agustus 2011.

3.3 Identifikasi Penelitian

3.3.1 Variabel Penelitian

a. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah senyawa polifenol ekstrak biji kakao (*Theobroma cacao* L).

b. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus*.

c. Variabel Terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah suspensi *Lactobacillus acidophilus*, media pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus* (*Mannitol Rogosa and Sharpe*/MRS), serta suhu inkubasi (37 ^{0}C) dan lama inkubasi (24 jam).

3.3.2 Definisi Operasional

a. Senyawa polifenol ekstrak biji kakao adalah senyawa yang diperoleh dari ekstrak biji kakao dengan cara merendam bubuk biji kakao bebas lemak menggunakan alkohol 70% dengan perbandingan bahan dan pelarut 1:3 selama 3 jam pada suhu 30-60^0 C selanjutnya bahan disaring dengan pompa vakum dan melakukan proses evaporasi dengan evaporator berputar pada suhu 45-50^0 C (Harmawan, 2010:30-31 dan Setiadevi, 2010:26)
b. Efek senyawa polifenol ekstrak biji kakao terhadap pertumbuhan bakteri *Lactobacillus acidophilus* diketahui dari adanya zona hambat yaitu daerah atau wilayah jernih yang tampak di sekeliling lubang sumuran (Astanti, 2009:17).

3.4 Sampel Penelitian

3.4.1 Jumlah Sampel

Jumlah sampel dalam penelitian ini sebanyak 12 buah yang dihitung dengan menggunakan rumus dari Steel dan Torrie (Lampiran A). Jumlah keseluruhan sampel pada penelitian ini adalah 36 buah yang terbagi dalam 3 kelompok perlakuan.

3.4.2 Pengelompokan Sampel

Sampel dibagi 3 kelompok perlakuan yaitu :

a. Kelompok kontrol negatif (aquades steril)
b. Kelompok kontrol positif (obat kumur chlorhexidine 0,2%)
b. Kelompok senyawa polifenol ekstrak biji kakao

3.5 Alat dan Bahan Penelitian

3.5.1 Alat-alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu : *Petridish*, spidol, tabung *Erlenmeyer* (Pyrex, *Japan*), tabung reaksi (Pyrex, *Japan*), neraca (Cent-O-Cram, Ohaus, USA), ose, gigaskrin, *incubator* (WTC Binder, *Germany*), *dry*

heat oven, gelas ukur (Pyrex, *Japan*), *syringe*, jangka sorong dengan derajat ketelitian 0,5 mm (Medesy, *Italy*), spektrofotometer (Milton Roy, *Germany*), *thermolyne* (Maxi Mix II, Dubuque, Iowa, *USA*), *laminar flow* (tipe HF-100, *Korea*), *desicator* (Kartell, *Italy*), sedotan plastik, spatula, kompor (Maspion, Indonesia), *autoclave* (Memmert, *Germany*), mikropipet (Eppendorf, *Germany*), *object glass, deck glass*, bunsen, mikroskop cahaya.

3.5.2 Bahan Penelitian

Bahan - bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu : MRS-A/*Mannitol Rogosa and Sharpe-Agar* (Merck, Jerman), MRS-B/*Mannitol Rogosa and Sharpe-Broth* (Merck, Jerman), aquades steril, alkohol 70 %, obat kumur yang mengandung Chlorhexidine 0,2 % (Minosep, Indonesia), kapas, senyawa polifenol ekstrak biji kakao (Pusat Penelitian Kopi dan Kakao, Jember) (Lampiran B), bakteri *Lactobacillus acidophilus* (Laboratorium Mikrobiologi Fakultas MIPA Universitas Jember, Jember), larutan standar Mc. Farland 1, minyak emersi, pewarna Gram.

3.6 Prosedur Penelitian

Semua prosedur dikerjakan pada *laminar flow* untuk mencegah kontaminasi dari lingkungan luar.

3.6.1 Tahap Persiapan

a. Sterilisasi alat

Semua alat yang terbuat dari kaca dicuci bersih kemudian disterilkan dalam *dry heat oven* selama 15 menit dengan suhu 110^{o} C sedangkan semua alat yang terbuat dari plastik dicuci bersih dan dikeringkan kemudian diulas alkohol 70% (Astanti, 2009:19).

b. Identifikasi bakteri

Bakteri *Lactobacillus acidophilus* diambil dari galur murni koleksi Laboratorium Mikrobiologi Fakultas MIPA Biologi Universitas Jember. Bakteri tersebut diidentifikasi secara mikroskopis menggunakan preparat ulas yang diberi pewarnaan Gram.

c. Menyiapkan media cair MRS-B (*Mannitol Rogosa Sharpe Broth*)

Menimbang 5,22 gram MRS-B menggunakan neraca dan mengukur aquades steril sebanyak 100 ml menggunakan gelas ukur. Kedua bahan dimasukkan dalam tabung *Erlenmeyer*, diaduk dengan spatula dan dipanaskan dengan kompor sampai mendidih. Kemudian media disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121º C selama 15 menit. Untuk memastikan bahwa media MRS-B dalam keadaan steril, maka media tersebut dimasukkan dalam *incubator* dengan suhu 37º C selama 24 jam (Astanti, 2009:20).

d. Menyiapkan media MRS-A (*Mannitol Rogosa Sharpe Agar*)

Menimbang 6,82 gram bubuk MRS-A menggunakan neraca dan mengukur aquades steril sebanyak 100 ml menggunakan gelas ukur. Kedua bahan dimasukkan dalam tabung *Erlenmeyer*, diaduk dengan spatula dan dipanaskan dengan kompor sampai mendidih. Setelah itu tabung *Erlenmeyer* ditutup dengan kapas dan disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121º C selama 15 menit. Untuk memastikan bahwa media MRS-B dalam keadaan steril, maka media tersebut dimasukkan dalam *incubator* dengan suhu 37º C selama 24 jam (Astanti, 2009:21).

e. Membuat suspensi *Lactobacillus acidophilus*

Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan cara sebagai berikut.

1) Satu ose bakteri *Lactobacillus acidophilus* dari galur murni dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi media cair MRS-B sebanyak 2 ml, kemudian tabung reaksi tersebut ditutup kapas dan dimasukkan dalam *desicator* untuk mendapatkan suasana fakultatif anaerob. Selanjutnya

desicator dimasukkan ke dalam *incubator* dengan suhu 37º C selama 2 x 24 jam untuk mempertahankan suhu luar *desicator*.

2) Setelah 2 x 24 jam suspensi *Lactobacillus acidophilus* dalam tabung reaksi tersebut dikocok menggunakan *thermolyne* dan diukur tingkat kekeruhannya menggunakan spektrofotometer dengan larutan standar Mc. Farland 1.
3) Skala absorban dari suspensi *Lactobacillus acidophilus* tersebut harus sesuai skala absorban dengan larutan standar Mc. Farland 1.

3.6.2 Tahap Perlakuan

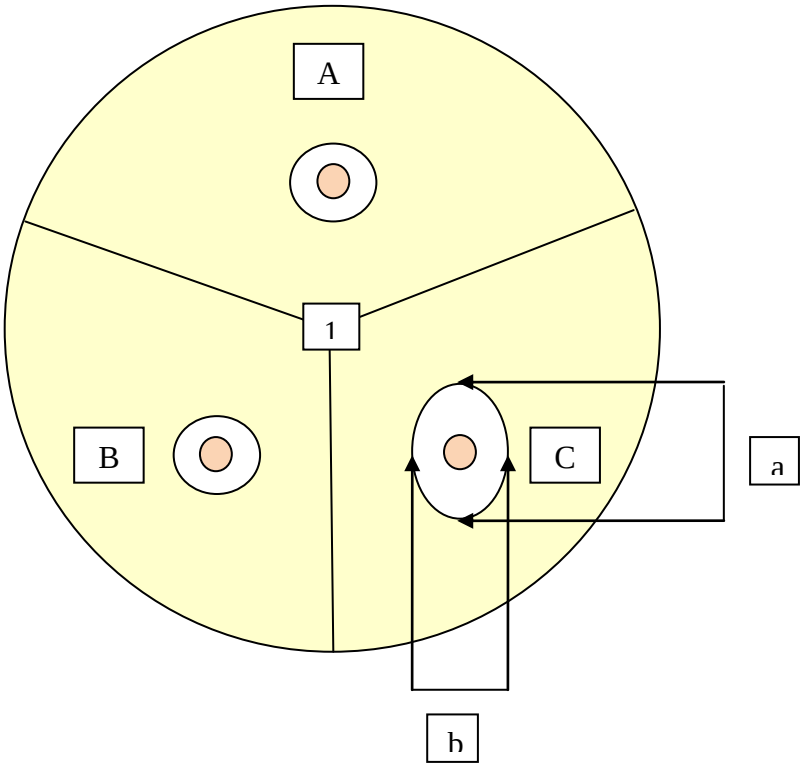
a. Bagian bawah *Petridish* yang akan diisi media MRS-A dibagi menjadi 3 daerah dengan menggunakan spidol dan masing-masing daerah diberi kertas label bertuliskan A (kontrol negatif), B (kontrol positif) dan C (senyawa polifenol ekstrak biji kakao). Untuk membedakan keduabelas *Petridish* maka pada bagian tengahnya diberi tanda nomor urut 1 sampai 12.
b. Inokulasi *Lactobacillus acidophilus* menggunakan metode *pour plate* dengan cara sebagai berikut: media MRS-A hangat sebanyak 25 ml dituangkan dalam *Petridish*, kemudian suspensi bakteri *Lactobacillus acidophilus* sebanyak 0,5 ml diinokulasikan pada media tersebut dan diratakan dengan gigaskrin. Setelah itu ditunggu sampai padat.
c. Membuat lubang sumuran (diameter 5 mm dan kedalaman 4 mm) pada media yang telah diinokulasikan bakteri *Lactobacillus acidophilus* dengan menggunakan sedotan plastik. Pada setiap *Petridish* terdapat 3 lubang sumuran yang dibuat di daerah A, B dan C (Gambar 3.1).
d. Memasukkan aquades steril sebanyak 5 µL ke dalam lubang sumuran pada daerah A, obat kumur chlorhexidine 0,2 % sebanyak 5 µL ke dalam lubang sumuran pada daerah B dan senyawa polifenol ekstrak biji kakao sebanyak 5 µL ke dalam lubang sumuran pada daerah C dengan menggunakan

mikropipet. Masing-masing perlakuan tersebut dilakukan pengulangan sebanyak 12 kali.

e. *Petridish* yang berisi media lempeng MRS-A yang sudah diinokulasi dengan *Lactobacillus acidophilus* dan diberi perlakuan dimasukkan *desicator* untuk mendapatkan suasana fakultatif anaerob. Kemudian *desicator* diletakkan dalam *incubator* dengan suhu 37ºC selama 24 jam.

3.6.3 Tahap Pengukuran

a. Setelah diinkubasi selama 24 jam *Petridish* dikeluarkan dari *incubator* dan dilakukan pengukuran diameter zona hambat.
b. Cara pengukuran diameter zona hambat :
    1) *Petridish* dibalik agar terlihat jelas zona hambatnya.
    2) Mengukur diameter zona hambat menggunakan jangka sorong dan dicatat dengan ketentuan sebagai berikut :
        a) Apabila ada diameter zona hambat yang besar dan kecil maka keduanya dijumlah kemudian dibagi dua dan dicatat. Misalnya didapatkan zona hambat berbentuk lonjong, maka pengukuran diameter yang paling besar (misal a mm) dan diameter yang paling pendek (misal b mm) dilakukan dengan menggunakan jangka sorong kemudian keduanya dijumlah dan dibagi dua (Gambar 3.1). Jadi diameter zona hambat (x) = $\frac{a+b}{2}$ (Hardman *et al*, 2001:1159).
        b) Pengukuran dilakukan oleh 3 pengamat dan diambil rata – rata (Hardman *et al*, 2001:1159).

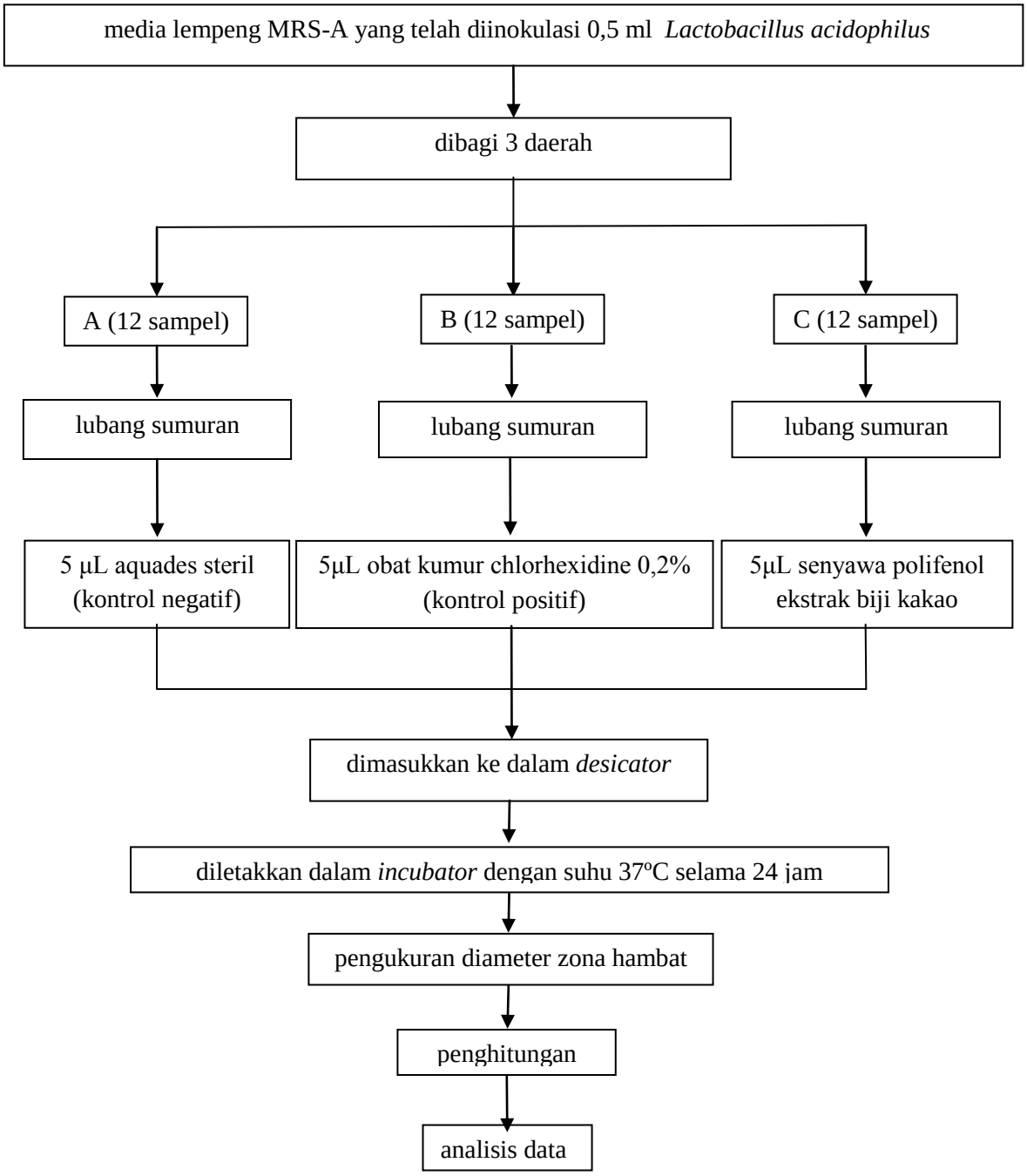


Gambar 3.1 Pengukuran diameter zona hambat

Keterangan :

A : kelompok kontrol negatif
B : kelompok kontrol positif
C : kelompok senyawa polifenol ekstrak biji kakao
1 : nomor urut *Petridish*
: lubang sumuran
a : diameter zona hambat paling besar
b : diameter zona hambat paling kecil

3.6.4 Alur Penelitian



3.7 Analisis Data

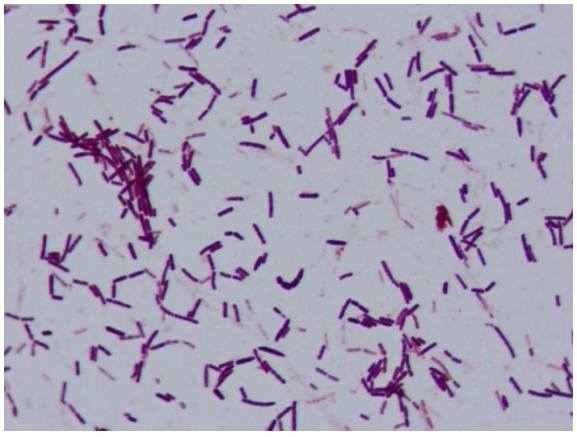
Data hasil penelitian dilakukan uji Kolmogorov Smirnov dan uji Lavene. Apabila kedua uji menunjukkan data normal dan homogen (p>0,05) maka

dilakukan uji parametrik dengan Anova Satu Arah untuk mengetahui adanya perbedaan antar kelompok kemudian dilanjutkan dengan uji Tukey HSD untuk mengetahui besarnya perbedaan antar kelompok. Tetapi jika datanya tidak terdistribusi normal atau tidak homogen dilanjutkan dengan uji statistik non parametrik Kruskal Wallis ($p< 0,05$), dan dilanjutkan dengan uji statistik Mann-Whitney ($p< 0,05$).

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Hasil

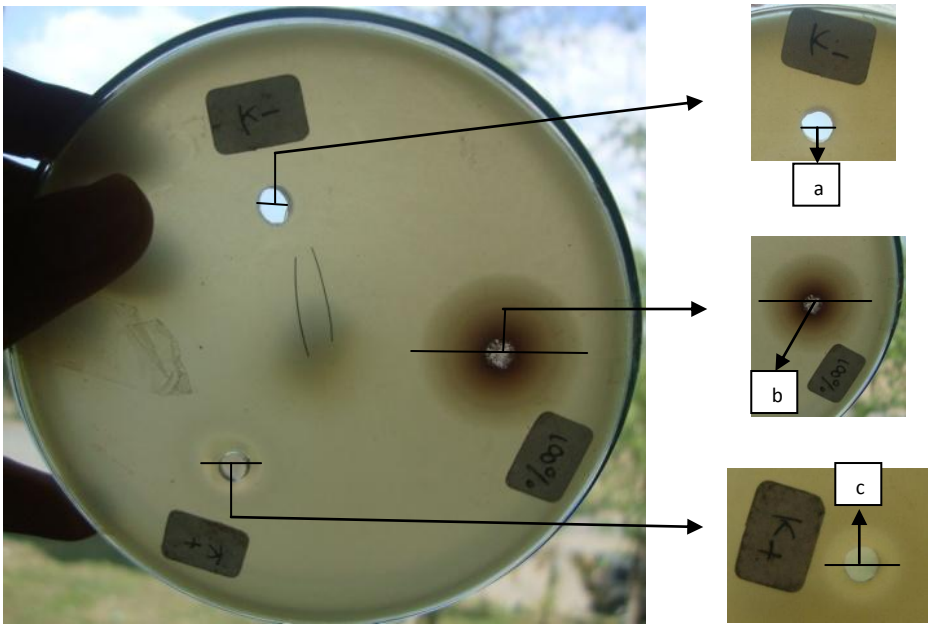
Hasil identifikasi galur murni *Lactobacillus acidophilus* secara mikroskopis dengan pengecatan Gram dapat dilihat pada gambar 4.1 dibawah ini.



Gambar 4.1 Identifikasi *Lactobacillus acidophilus* dilihat dengan mikroskop cahaya pembesaran 1000x

Pada gambar diatas terlihat bahwa semua sel bakteri memiliki bentuk yang sama yaitu batang dengan warna ungu artinya galur tersebut murni *Lactobacillus acidophilus* tanpa ada kontaminasi dari bakteri atau mikroba lain; ungu menunjukkan *Lactobacillus acidophilus* merupakan golongan bakteri Gram positif.

Hasil penelitian tentang efek senyawa polifenol ekstrak biji kakao terhadap pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus* dapat dilihat pada gambar 4.2 dibawah ini.



Gambar 4.2 Diameter zona hambat terhadap pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus*

Keterangan:
a : diameter zona hambat kelompok kontrol negatif
b : diameter zona hambat kelompok kontrol positif
c : diameter zona hambat kelompok senyawa polifenol ekstrak biji kakao

Pada gambar diatas terlihat bahwa di sekitar lubang sumuran yang diberi aquades steril (kontrol negatif) tidak tampak adanya zona hambat, sedangkan di sekitar lubang sumuran yang diberi chlorhexidine 0,2% (kontrol positif) dan senyawa polifenol ekstrak biji kakao tampak adanya zona hambat.

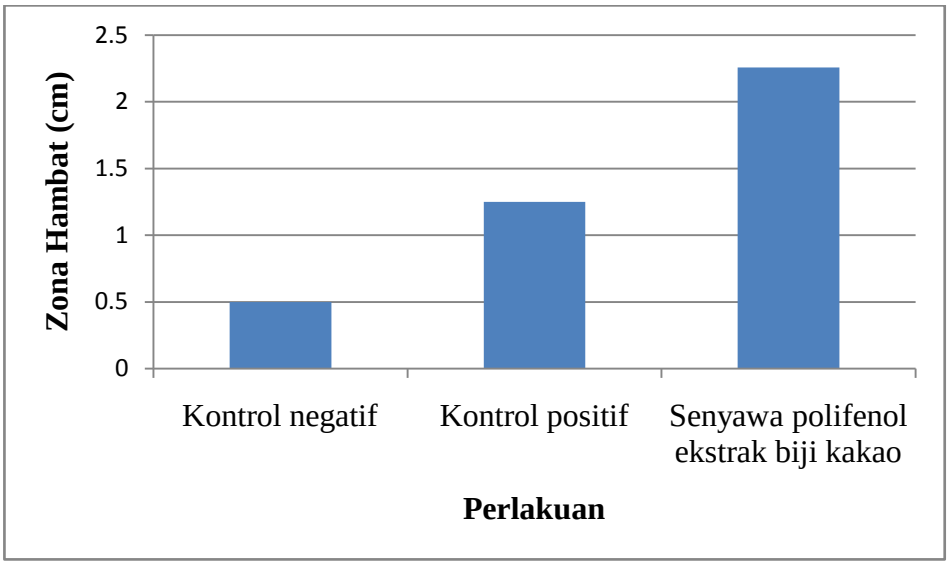
Pengukuran diameter zona hambat ini dilakukan oleh 3 pengamat (Lampiran D), kemudian ketiga hasil pengukuran tersebut diambil rata-ratanya. Berdasarkan hasil penghitungan diperoleh data yang dapat dilihat pada tabel 4.1

Tabel 4.1 Hasil pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus*

Plate	Kontrol negatif (cm)	Kontrol positif (cm)	Senyawa polifenol ekstrak biji kakao (cm)
1	0,5	1,25	2,20
2	0,5	1,35	2,40
3	0,5	1,45	2,35
4	0,5	1,20	2,00
5	0,5	0,90	2,05
6	0,5	1,15	2,15
7	0,5	1,50	2,62
8	0,5	1,25	2,40
9	0,5	1,35	2,36
10	0,5	1,10	2,10
11	0,5	1,20	2,15
12	0,5	1,30	2,30
M	0,5000	1,2500	2,2567
SD	0,00000	0,16096	0,17296

Keterangan :
M : nilai rata – rata diameter zona hambat
SD : standart deviasi (simpang baku) diameter zona hambat

Kelompok senyawa polifenol ekstrak biji kakao memiliki nilai rata - rata diameter zona hambat yang paling besar yaitu 2,2567 cm. Kemudian diikuti kelompok kontrol positif dengan nilai rata - rata diameter zona hambat 1,2500 cm. Sedangkan pada kelompok kontrol negatif memiliki rata-rata diameter zona hambat 0,5000 cm (Gambar 4.3).



Gambar 4.3 Histogram rata-rata diameter zona hambat pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus*

Data yang diperoleh kemudian dilakukan uji normalitas untuk mengetahui apakah data pada masing – masing kelompok terdistribusi normal dan uji homogenitas untuk mengetahui ragam populasi, apakah setiap varian penelitian ini sama atau homogen.

Uji normalitas menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov dengan kriteria pengambilan keputusan adalah sebagai berikut.

1. bila nilai signifikansi lebih besar 0,05 maka data terdistribusi normal
2. bila nilai signifikansi lebih kecil 0,05 maka data tidak terdistribusi normal

Tabel 4.2 Uji Kolmogorov- Smirnov

N	36
Kolmogorov-Smirnov	1,219
Asymp. Sig (2-tailed)	0,102

Uji normalitas pada Tabel 4.2 diperoleh nilai signifikansi 0,102 dimana nilai ini lebih besar dari 0,05 sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa data pada Tabel 4.1 terdistribusi normal.

Setelah data dikatakan normal kemudian dilakukan uji homogenitas varian menggunakan uji Levene dengan kriteria pengambilan keputusan adalah sebagai berikut.

1. bila nilai signifikansi lebih besar 0,05 maka data homogen
2. bila nilai signifikansi lebih kecil 0,05 maka data tidak homogen

Tabel 4.3 Uji Levene

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
11,448	2	33	0,000

Uji homogenitas pada Tabel 4.3 diketahui bahwa nilai signifikansinya lebih kecil dari 0,05 yaitu 0,000 artinya data pada Tabel 4.1 tidak homogen.

Berdasarkan hasil kedua uji di atas maka data hasil penelitian ini selanjutnya akan diuji menggunakan uji statistik nonparamaterik. Untuk mengetahui apakah ada perbedaan diameter zona hambat pada masing – masing kelompok perlakuan dilakukan uji Kruskal Wallis dengan kriteria pengambilan keputusan adalah sebagai berikut.

1. bila nilai signifikansi lebih kecil 0,05 maka data masing-masing kelompok perlakuan memiliki perbedaan.
2. bila nilai signifikansi lebih besar 0,05 maka data masing-masing kelompok perlakuan tidak memiliki perbedaan.

Tabel 4.4 Uji Kruskal Wallis

Chi-Square	Df	Asymp. Sig.
37.347	2	0,000

Hasil uji Kruskal Wallis pada Tabel 4.4 menunjukkan nilai α=0,000 artinya masing kelompok perlakuan memiliki perbedaan diameter zona hambat yang signifikan.

Selanjutnya untuk mengetahui perbandingan diameter zona hambat antar kelompok perlakuan maka dilakukan uji Mann Whitney dengan kriteria pengambilan keputusan adalah sebagai berikut.

1. bila nilai signifikansi lebih kecil 0,05 maka data antar kelompok perlakuan memiliki perbedaan.
2. bila nilai signifikansi lebih besar 0,05 maka data antar kelompok perlakuan tidak memiliki perbedaan.

Tabel 4.5 Uji Mann Whitney

Kelompok Perlakuan	kontrol negatif	kontrol positif	senyawa polifenol ekstrak biji kakao
kontrol negatif	-	0,000*	0,000*
kontrol positif	0.000*	-	0,000*
senyawa polifenol ekstrak biji kakao	0,000*	0.000*	-

Keterangan : tanda * menunjukkan nilai yang signifikan

Hasil uji Mann Whitney pada Tabel 4.5 dapat diketahui bahwa antara diameter kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif dan kelompok senyawa polifenol ekstrak biji kakao mempunyai diameter zona hambat yang berbeda secara signifikan ($\alpha < 0,05$).

3.2 Pembahasan

Pengukuran efek senyawa polifenol ekstrak biji kakao terhadap pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus* pada penelitian ini menggunakan metode difusi sumuran (*well diffusion method)* yang diketahui dari adanya zona hambat. Zona hambat adalah daerah jernih disekeliling lubang sumuran yang menunjukkan terhambatnya pertumbuhan bakteri. Semakin besar diameter zona hambatnya, berarti semakin besar kemampuan bahan dalam menghambat pertumbuhan bakteri (antibakteri). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa senyawa polifenol ekstrak biji kakao mampu menghambat pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus.*

Polifenol kakao terdiri dari 3 kelompok yaitu katekin (flavan-3-ols) 37%, antosianin 4% dan proantosianidin 58% (Wollgast dan Anklam (2000) dalam Porbowaseso, 2005:7). Katekin adalah senyawa polifenol alami, merupakan metabolit sekunder dan termasuk dalam penyusun golongan tanin. Proantosianidin adalah nama lain dari tanin yang terkondensasi.

Tanin mempunyai daya antibakteri dengan cara mempresipitasikan protein, karena diduga tanin mempunyai efek yang sama dengan senyawa fenolat. Secara umum efek antibakteri tanin antara lain bereaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim dan destruksi atau inaktivasi fungsi materi genetik bakteri (Masduki (1996) dalam Grandiosa, 2010:11).

Sedangkan antosianin tergolong pigmen yang disebut flavonoid. Flavonoid merupakan golongan terbesar dari senyawa fenol. Özçelik *et al* (2008:1154) menyatakan bahwa tidak ada perbedaan daya antibakteri dari berbagai jenis flavonoid. Singh (2005) dalam Rinawati (2010:9) menyatakan senyawa fenol memiliki mekanisme kerja dalam menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara membentuk komplek dengan protein ekstraseluler menginaktivasi enzim dan merusak membran sel. Seperti diketahui sebagian besar struktur dinding sel dan membran sitoplasma bakteri mengandung protein dan lemak, sehingga bila fenol berikatan dengan protein (melalui ikatan hidrogen)

akan mengakibatkan struktur protein menjadi rusak. Ketidakstabilan pada dinding sel dan membran sitoplasma bakteri menyebabkan fungsi permeabilitas selektif, fungsi pengangkutan aktif, pengendalian susunan protein dari sel bakteri menjadi terganggu, yang berakibat pada terlepasnya makromolekul dan ion dari sel. Pada akhirnya sel bakteri menjadi kehilangan bentuk dan terjadi lisis (Susanti (2008) dalam Rinawati 2010:9). Gisvold (1982) dalam Sabir (2005:40) menyatakan bahwa flavonoid menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom sebagai hasil interaksi antara flavonoid dengan DNA bakteri.

Kemampuan senyawa polifenol ekstrak biji kakao dalam menghambat pertumbuhan bakteri juga bisa dipengaruhi oleh sifat dinding sel yang dimiliki bakteri uji. Fardias (1983) dalam Zuhud *et al* (2001:11) menyatakan bahwa bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif mempunyai dinding sel yang berbeda sensitivitasnya terhadap perlakuan fisik, enzim dan antibiotik. Senyawa polifenol ekstrak biji kakao terbukti mampu menghambat bakteri *Lactobacillus acidophilus* yang merupakan bakteri Gram positif. Hal ini juga didukung oleh pernyataan Pelczar dan Chan (1986) dalam Kusmiyati dan Agustini (2007:51) bahwa bakteri Gram positif cenderung lebih peka terhadap komponen antibakteri. Hal ini disebabkan oleh struktur dinding sel bakteri Gram positif yang lebih sederhana sehingga mempermudah senyawa antibakteri masuk ke dalam sel dan menemukan target sasaran. Sedangkan struktur dinding sel bakteri Gram negatif lebih kompleks dan berlapis tiga, yaitu lapisan luar berupa lipoprotein, lapisan tengah yang berupa peptidoglikan dan lapisan dalam lipopolisakarida sehingga bakteri Gram negatif memiliki ketahanan yang lebih baik dibandingkan bakteri Gram positif. Branen dan Davidson (1993) dalam Zuhud *et al* (2001:11) menyatakan bahwa bakteri Gram negatif memiliki sistem seleksi terhadap zat-zat asing yaitu pada lapisan lipopolisakaridanya. Meskipun demikian, menurut Cowan (1999) dalam Kusmarwati dan Indriati (2008:33) senyawa flavonoid pada

umumnya dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan Gram negatif.

Kontrol positif pada penelitian ini menggunakan obat kumur yang mengandung chlorhexidine 0,2%. Chlorhexidine termasuk kedalam kelompok ikatan kimia yang dikenal dengan bisguanida yang bersifat fungisid, bakteriostatik atau bakterisid baik pada bakteri Gram positif dan Gram negatif (Marsh dan Martin, 1999:98). Sifat bakteriostatik bila konsentrasi antara 4–32 μg/ml, konsentrasi yang lebih tinggi akan menyebabkan efek bakterisid, karena terjadinya presipitasi (pengendapan) protein plasma (Charles (2004) dalam Suparwi, 2010:13).

Meskipun obat kumur yang mengandung chlorhexidine 0,2 % diketahui banyak digunakan sebagai terapi bagi orang yang rentan karies (Marsh dan Martin, 1999:98), ternyata hasil penelitian ini menunjukkan bahwa senyawa polifenol ekstrak biji kakao memiliki kemampuan lebih baik dalam menghambat pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus* dibandingkan dengan kontrol positif. Hal ini kemungkinan disebabkan perbedaan konsentrasi yang cukup jauh antara senyawa polifenol ekstrak biji kakao dan obat kumur chlorhexidine 0,2%. Konsentrasi senyawa polifenol ekstrak biji kakao adalah 100%, sedangkan obat kumur chlorhexidine hanya 0,2% sehingga mempengaruhi kemampuan bahan dalam menghambat pertumbuhan bakteri.

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari hasil penelitian ini bahwa senyawa polifenol ekstrak biji kakao mempunyai kemampuan dalam menghambat pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus.*

5.2 Saran

5.2.1 Perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kemampuan senyawa polifenol ekstrak biji kakao dalam berbagai konsentrasi yang mampu menghambat pertumbuhan dan membunuh *Lactobacillus acidophilus.*

5.2.2 Perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk membuat sediaan senyawa polifenol ekstrak biji kakao yang dapat diaplikasikan untuk pencegahan atau perawatan karies gigi dengan mempertimbangkan rasa pahit pada senyawa polifenol tersebut.

5.2.3 Perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kemampuan senyawa polifenol ekstrak biji kakao dalam menghambat pertumbuhan mikroba patogen lainnya dalam rongga mulut.

DAFTAR BACAAN

Buku

Astanti, L. S. 2009. "Pengaruh Perasan Buah Mengkudu (Morindacitrifolia) dan Betadine Obat Kumur terhadap Pertumbuhan Lactobacillus sp." Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Erniati, 2007. "Efek Konsumsi Minuman Bubuk Kakao Bebas Lemak Terhadap Sifat Antioksidatif dan Prolifertif Limfosit Manusia." Tidak Diterbitkan. Tesis. Bogor : Institut Pertanian Bogor.

Hardman, J. G., Limbird, L. E., dan *Gilman*, A. G. 2001. *Goodman and Gillman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 10th Edition*. USA: The McGraw-Hill Compannies, Inc.

Harmawan, S. 2010. "Pemanfaatan Ekstrak Polifenol Biji Kakao (*Theobroma cacao L*) Kering *Non Fermented* Terserang *Conopomorpha cramerella Snellen* dan *Phytopthora palmivora Butler* sebagai Antibakteri." Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember: Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Herdiyati, Y. 2007. *Keberadaan Bakteri-Bakteri Pembawa Gen Gtf B/C yang Mengekspresikan Enzim Glukosil Transferase pada Anak Rampan Karies.* Bandung: Universitas Padjajaran.

Ibtisam, 2008. "Optimasi Pembuatan Ekstrak Daun Dewandaru (Eugenia uniflora L.) Menggunakan Metode Perlokasi dengan Parameter Kadar Total Senyawa Fenolik dan Flavonoid." Tidak Diterbitkan. Tesis. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

Ide, P. 2008. *Dark Chocholate Healing Mengungkap Kasiat Cokelat terhadap Sirkulasi Darah & Imunitas Tubuh.* Jakarta: PT Elex Media Komputindo.

Kidd, E. A. M. & Bechal, S. J. 1992. *Dasar – dasar Karies: Penyakit dan Penanggulangannya*. Alih Bahasa: N. Sumawinata dan Safrida F. Judul Asli" *Essential of Dental Carries: The Dissease and It's Management "*. Jakarta: EGC.

Marsh, P & Martin, M. V. 1999. *Oral Microbiology* Fourth edition. Great Britain : MPG Books Ltd.

Porbowaseso, T. 2005. "Ekstraksi Polifenol Biji Kakao secara Kimiawi sebagai Antioksidan dan Pewarna Alami." Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember: Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Pratiwi, D. 2007. *Merawat Gigi Sehari – hari*. Jakarta: Penerbit Buku Kompas.

Setiadevi, S. 2010. "Karakteristik Ekstrak Polifenol Biji Kakao Non Fermented dari Berbagai Macam Metode Ekstraksi." Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember: Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Schlegel, H. G & Schmidt, K. 1994. *Mikrobiologi Umum*. Alih Bahasa: Tedjo Baskoro. Judul Asli *"Common of Microbiology"*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.

Sunanto, H. 1992. *Cokelat Pengolahan Hasil dan Aspek Ekonominya*. Yogyakarta: Kanisius.

Suparwi, A. D. 2010. *Perbedaan Efektivitas Obat Kumur Chlorhexidine dan Methylsalicylate dalam Menurunkan Jumlah Koloni Bakteri Rongga Mulut*. Surakarta: Universitas Sebelas Maret.

Susanto. 1994. *Tanaman Kakao Budidaya dan Pengolahan Hasil*. Yogyakarta: Kanisius.

Tarigan, R. 1992. *Kesehatan Gigi dan Mulut*. Jakarta: EGC.

Tarigan, R. 1995. *Karies Gigi*. Jakarta: Hipokrates.

Toni, H. 1997. *Atlas Berwarna Mikrobiologi Kedokteran*. Jakart: Hipokrates

Tjitrosoepomo. 2007. *Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta)*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.

Winarno, F. G. 1992. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: PT Gramedia

Jurnal

Ahumada, M. C., Bru, E., Colloca, M. E., Lopez, M. E., dan Macias, M. E. N. 2003. Evaluation and Comparison of Lactobacilli Characteristics in the Mouths of Patients With or Without Cavities. *Journal of Oral Science*. Vol. 45 (1): 1-9.

Badet, C. & Thebaud, N. B. 2008. Ecology of Lactobacilli in the Oral Cavity: A Review of Literature. *The Open Microbiology Jurnal*. Vol. 2: 38-48.

Buttris, J. 1997. Nutritional Properties of Fermented Milk Products. *International Journal of Dairy Technology*. Vol. 50(1): 21-27.

Grandiosa, R. 2010. *Efektivitas Penggunaan Larutan Filtrat Jintan Hitam (Nigella sativa) dengan Konsentrasi Berbeda terhadap Pertumbuhan Bakteri Aeromonas hydrophila secara In-vitro dan Uji Toksisitasnya terhadap Ikan Mas (Cyprinus carpio)*. Jatinangor: Universitas Padjajaran

Hii, C. L., Lawi, C. L., Suzannah, S., Misnawi, dan Clokei, M. 2009. Polyphenol in cocoa (*Theobrama cacao* L). *Asian Journal of Food and Agro Industry*. Vol. 2 (4): 702-722.

Kurniawati, A. 2007. Efektifitas Infusum Daun Wungu sebagai Obat Kumur Antiseptik terhadap Jumlah Koloni Bakteri dalam Saliva. *Spirulina Jurnal Penelitian Kesehatan dan Farmasi*. Edisi Khusus April.

Kusmarwati & Indriati. 2008. Daya Hambat Ekstrak Bahan Aktif Biji Picung (*Pangium redule* Reinw.) terhadap Pertumbuhan Bakteri Penghasil Histamin. *Jurnal Pasca Panen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. Vol.3 (1): 29-35.

Kusmiyati & Agustini, N. W. S. 2007. Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga *Porphyridium cruentum*. *Biodiversitas*. Vol. 8 (01): 48-53.

Lestari, C., Widjijono, Murdiastuti, K. 2009. Pengaruh Ekstrak Gambir Terstandarisasi (*Uncaria Gambir* (Hunter) Roxb) sebagai Periodontal Dressing terhadap Penyembuhan Luka Gingiva Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*). *Majalah Kedokteran Gigi*. Vol. 16 (1): 7-12.

Lucida, H., Bakhtiar, A., Putri, W. A. 2007. Formulasi Sediaan Antiseptik Mulut dari Katekin Gambir. *J. Sains Tek Farmasi*. Vol. 12 (1): 1-7.

Méndez, C. R., Badet, C., Yanez, A., Dominguez, M. L., Giono, S., Richard, B., Nancy, J., dan Dorignac, G. 2009. Identification of Oral Strains of Lactobacillus species Isolated from Mexican and French Children. *Journal of Dentistry and Oral Hygiene.* Vol. 1 (1): 9-16.

Özçelik, B., Orhan, D. D., Özgen, S., dan Ergun, F. 2008. Antimicrobial Activity of Flavonoids against Extended-Spectrum β-Lactamase (ESβL)-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. Vol. 7 (4). 1151-1157.

Pambayun, R., Gardjito, M., Sudarmadji, S., dan Kuswanto, K. 2007. Kandungan Fenol dan Sifat Antibakteri dari Berbagai Jenis Ekstrak Produk Gambir (*Uncaria gambir* Roxb). *Majalah Farmasi Indonesia*. Vol. 18 (3): 141-146.

Purwandani, S.N. & Rahayu, E.S. 2003. Isolasi dan Identifikasi Lactobacillus yang Berpotensi sebagai Agensia Probiotik. *Agritech.* Vol. 23 (2): 67-64.

Rinawati, N. D. 2010. *Daya Antibakteri Tumbuhan Majapahit (Crescentia cujete L.) terhadap Bakteri Vibrio alginolyticus*. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh November.

Sabir, A. 2005. Aktivitas antibakteri flavonoid propolis *Trigona sp* terhadap bakteri *Streptococcus mutans* (in vitro). *Majalah Kedokteran Gigi (Dentist Journal).* Vol. 38 (2): 135–141.

Sartini, Djide, M. N., dan Alam, G. 2007. Ekstraksi Komponen Bioaktif dari Limbah Kulit Buah Kakao dan Pengaruhnya terhadap Aktivitas

Antioksidan dan Antimikroba. *Journal of Traditional Medicine.* Vol. 14 (47): 35-40.

Soesilo, Santoso, R. E., dan Diyatri, I. 2005. Peranan Sorbitol dalam Mempertahankan Kestabilan pH Saliva pada Proses Pencegahan Karies. *Majalah Kedokteran Gigi (Dentist Journal).* Vol. 38 (1): 25-28. Surabaya: UNAIR.

Subiarto, Mirawaty. 2002. Penyerapan Sr-90 dengan Tanin. *Jurnal Penelitian P2PLR*. 43-46.

Yuniaswan, A. P. 2010. Efektivitas Ekstrak Daun Anting-anting (*Acalyphaindica*) sebagai Antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* secara in-vitro. Malang: Universitas Brawijaya.

Zuhud, E. A. M., Rahayu, W. P., Wijaya, C. H., dan Sari, P. P. 2001. Aktivitas Antimikroba Ekstrak Kedawung (*Parkia Roxburghii* G. Don) terhadap Bakteri Patogen. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. Vol. 12 (01): 6-12.

Internet

Anonim. 2009. *Lactobacillus acidophilus* [serial online]. http://www.theralac.com/. [30 Juni 2011].

Rusdin, 2011. Cara Meningkatkan Produksi Kakao Melalui Teknologi Sambung Samping [serial online]. http://epetani.deptan.go.id. [25 Januari 2012]

Lampiran A. Penghitungan besar sampel penelitian

Rumus penghitungan besar sampel menurut Steel dan Torrie adalah sebagai berikut,

$$n = \frac{(Z_{\alpha}+Z_{\beta})^2 \sigma\rho^2}{\delta^2}$$

keterangan :
n : besar sampel minimal
Zα : batas atas nilai konversi pada tabel distribusi normal untuk batas atas kemaknaan (1,96)
Z_{β} : batas bawah nilai konversi pada tabel distribusi normal untuk batas bawah kemaknaan (0,85)
$\sigma\rho^2$: diasumsikan $\sigma\rho^2 = \delta^2$
α : tingkat signifikansi (0,025)
β : 0,20
(Steel dan Torie, 1995 dalam Sudarso, 2007:38).

Penghitungan jumlah sampel penelitian

$$n = \frac{(Z_{\alpha}+Z_{\beta})^2 \sigma\rho^2}{\delta^2}$$

$$n = \frac{(1,96 + 0,85)^2 \cancel{\sigma\rho^2}}{\cancel{\delta^2}}$$

$$n = (1,96 + 0,85)^2$$

$$n = 7,8961 \approx 8$$

Hasil penghitungan yang diperoleh dengan menggunakan rumus di atas adalah minimal 8 sampel untuk setiap kelompok perlakuan. Pada penelitian ini digunakan 12 sampel untuk masing – masing kelompok perlakuan.

Lampiran B. Kriteria sampel biji kakao

Biji kakao yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari PTPN XII Banjarsari dengan kriteria:

4 Jenis kakao lindak

5 Dipetik dari buah kakao masak (umur 5-6 bulan), berwarna kuning atau jingga.

6 Proses pengeringan tanpa fermentasi

Lampiran C. Prosedur pembuatan senyawa polifenol ekstrak biji kakao

f. Menyiapkan ekstrak biji kakao

Biji kakao basah yang telah dipisahkan plasentanya menggunakan air kemudian dikeringkan di bawah sinar matahari selama 7 jam, dilanjutkan dengan pengeringan dengan oven pada suhu 50 ^{0}C sampai kadar air 7,5%. Selanjutnya biji kakao yang telah kering dihaluskan menggunakan blender kemudian dipisahkan lemaknya (*defatting*) dengan pengepresan sistem hidrolik dan direndam dalam pelarut petroleum benzen (titik didih 40-60 ^{0}C) selama 3 jam. Dari proses pemisahan lemak ini dihasilkan bubuk biji kakao bebas lemak (Harmawan, 2010:30).

g. Memisahkan senyawa polifenol dari ekstrak biji kakao kering

Bubuk biji kakao yang diperoleh kemudian direndam alkohol 70% selama 3 jam pada suhu 30-60 ^{0}C dan dipisahkan polifenolnya dengan perbandingan bahan dan pelarut 1 : 3. Bahan disaring dengan bantuan pompa vakum agar larutan terpisah dari rafinat (endapan bahan). Selanjutnya dilakukan proses evaporasi menggunakan evaporator berputar pada suhu 40-50 ^{0}C hingga didapatkan konsentrat polifenol yang pekat (Harmawan, 2010:30-31 dan Setiadevi, 2010:26).

Lampiran D. Hasil penelitian

Hasil pengukuran diameter zona hambat (cm) pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus*

Plate	Kontrol negatif			Kontrol positif			Senyawa polifenol ekstrak biji kakao		
	Pengamat ke-			Pengamat ke-			Pengamat ke-		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	0,5	0,5	0,5	1,20	1,20	1,35	2,20	2,21	2,20
2	0,5	0,5	0,5	1,35	1,33	1,36	2,32	2,45	2,43
3	0,5	0,5	0,5	1,44	1,46	1,45	2,35	2,35	2,34
4	0,5	0,5	0,5	1,20	1,21	1,20	2,00	2,00	2,01
5	0,5	0,5	0,5	0,95	0,95	0,80	2,05	2,04	2,07
6	0,5	0,5	0,5	1,15	1,15	1,14	2,13	2,17	2,16
7	0,5	0,5	0,5	1,50	1,50	1,50	2,60	2,62	2,63
8	0,5	0,5	0,5	1,26	1,26	1,25	2,40	2,40	2,40
9	0,5	0,5	0,5	1,36	1,37	1,32	2,36	2,37	2,36
10	0,5	0,5	0,5	1,11	1,10	1,10	2,15	2,13	2,03
11	0,5	0,5	0,5	1,15	1,20	1,25	2,14	2,15	2,16
12	0,5	0,5	0,5	1,30	1,31	1,30	2,30	2,30	2,30

Lampiran E. Analisis data

Descriptives

Zona Hambat

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
A (Kontrol Negatif)	12	.5000	.00000	.00000	.5000	.5000	.50	.50
B (Kontrol Positif)	12	1.2500	.16096	.04647	1.1477	1.3523	.90	1.50
C (Senyawa Polifenol Ekstrak Biji Kakao)	12	2.2567	.17926	.05175	2.1428	2.3706	2.00	2.62
Total	36	1.3356	.74230	.12372	1.0844	1.5867	.50	2.62

a. Uji normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Zona Hambat
N		36
Normal Parameters[a,b]	Mean	1.3356
	Std. Deviation	.74230
Most Extreme Differences	Absolute	.203
	Positive	.203
	Negative	-.148
Kolmogorov-Smirnov Z		1.219
Asymp. Sig. (2-tailed)		.102

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

b. Uji homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Zona Hambat

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
11.448	2	33	.000

c. Uji Kruskal Wallis

NPar Tests

Kruskal-Wallis Test

Test Statistics[a,b]

	Zona Hambat
Chi-Square	32.347
df	2
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan

d. Uji Mann-Whitney

Mann-Whitney Test Kelompok A : Kelompok B

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Zona Hambat	A (Kontrol Negatif)	12	6.50	78.00
	B (Kontrol Positif)	12	18.50	222.00
	Total	24		

Test Statistics[b]

	Zona Hambat
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	78.000
Z	-4.446
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000[a]

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Kelompok A : Kelompok C

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Zona Hambat	A (Kontrol Negatif)	12	6.50	78.00
	C (Senyawa Polifenol Ekstrak Biji Kakao)	12	18.50	222.00
	Total	24		

Test Statistics[b]

	Zona Hambat
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	78.000
Z	-4.444
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000[a]

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Mann-Whitney Test Kelompok B : Kelompok C

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Zona Hambat	B (Kontrol Positif)	12	6.50	78.00
	C (Senyawa Polifenol Ekstrak Biji Kakao)	12	18.50	222.00
	Total	24		

Test Statistics[b]

	Zona Hambat
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	78.000
Z	-4.161
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000[a]

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Lampiran F. Foto alat dan bahan penelitian

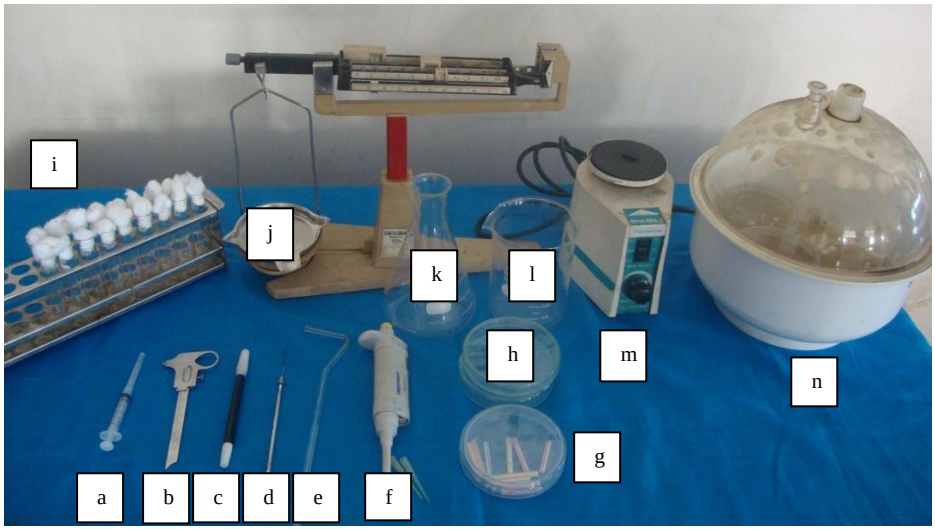


Foto 1. a. *syringe*, b. jangka sorong, c. spidol, d. ose, e. gigaskrin, f. mikropipet, g. sedotan plastik, h. *Petridish*, i. tabung reaksi, j. neraca, k. tabung *Erlenmeyer*, l. gelas ukur, m. *thermolyne*, n. *desicator*

Foto 2. Spektrofotometer

Foto 3. *Incubator*

Foto 3. *Laminar flow*

Foto 4. *Autoclave*

Foto 5. *Dry heat oven*

Foto 6. Kompor

Foto 7. a. MRS-B, b. MRS-A, c. aquades steril, d. polifenol ekstrak biji kakao, e. obat kumur yang mengandung chlorhexidine 0,2 %