



**KEMAMPUAN INHIBISI EKSTRAK DAUN KOPI ROBUSTA
(*Coffea canephora*) MENGGUNAKAN PELARUT ETANOL
TERHADAP PERTUMBUHAN *Lactobacillus acidophilus***

SKRIPSI

Oleh

Ikatanti Ratna Anggraini

NIM 131610101028

**BAGIAN BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2017**



**KEMAMPUAN INHIBISI EKSTRAK DAUN KOPI ROBUSTA
(*Coffea canephora*) MENGGUNAKAN PELARUT ETANOL
TERHADAP PERTUMBUHAN *Lactobacillus acidophilus***

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Kedokteran Gigi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran Gigi

Oleh

Ikatanti Ratna Anggraini

NIM 131610101028

**BAGIAN BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2017**

HALAMAN PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ayah tersayang Romli Tito yang telah bekerja keras selama ini, terima kasih atas doa, dukungan dan semangat yang telah diberikan;
2. Ibu tercinta Asucik Kusmiati atas kasih sayang, cinta, doa, semangat, motivasi, dan telah menguatkan selama ini;
3. Adikku satu-satunya Dhia Silmi Danisha, yang selalu menghibur dengan canda tawanya, dan selalu membuat bahagia;
4. Kakek dan nenek yang selalu memberikan doa dan dukungan, serta selalu tetap kuat dan sehat hingga saat ini;
5. Guru-guruku yang telah membimbingku sejak bangku TK hingga Perguruan Tinggi, atas ilmu yang diberikan;
6. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang telah membuatku kuat sejauh ini.

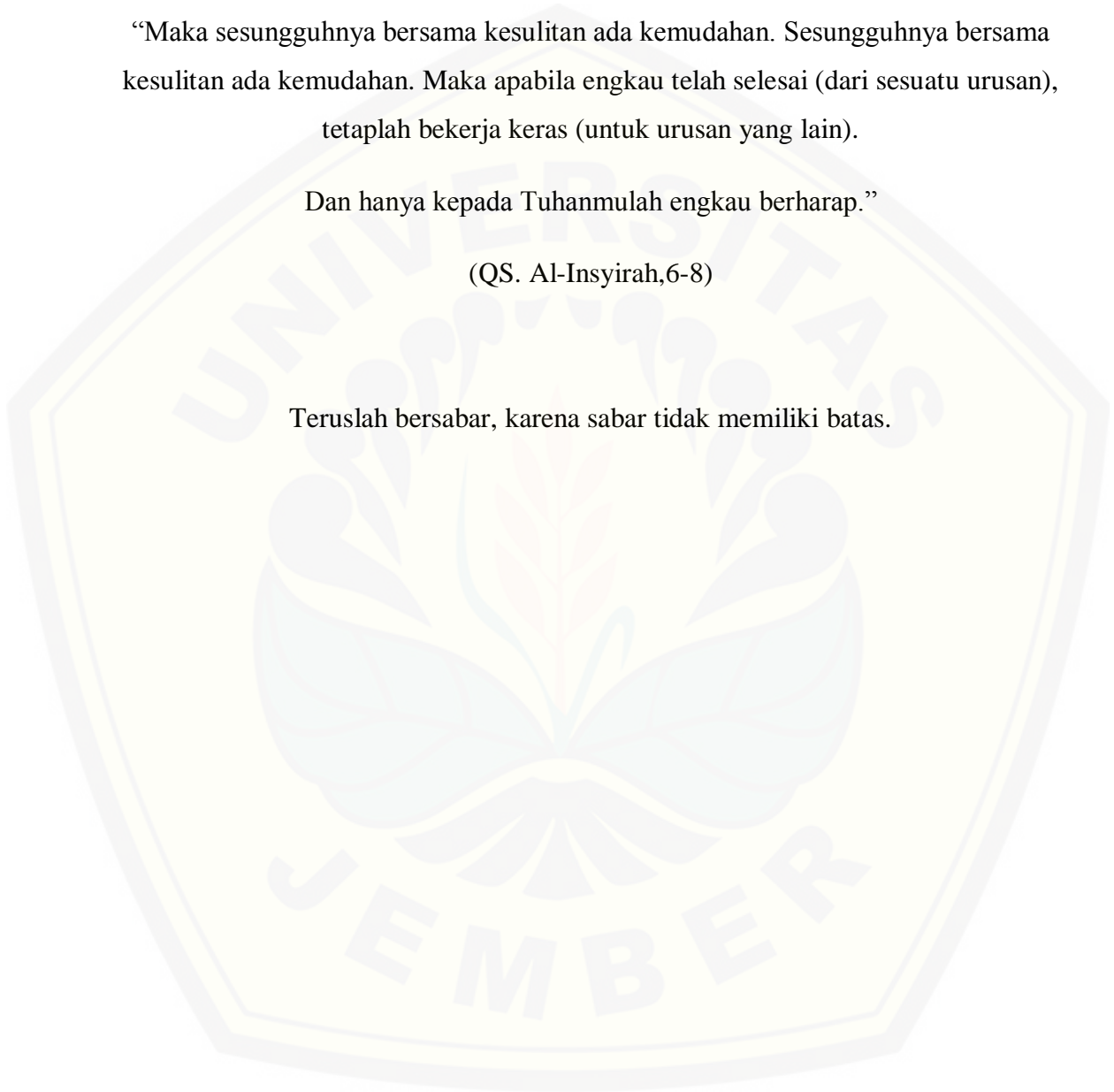
MOTTO

“Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Maka apabila engkau telah selesai (dari sesuatu urusan), tetaplah bekerja keras (untuk urusan yang lain).

Dan hanya kepada Tuhanmulah engkau berharap.”

(QS. Al-Insyirah,6-8)

Teruslah bersabar, karena sabar tidak memiliki batas.



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ikatanti Ratna Anggraini

NIM : 131610101028

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis ilmiah yang berjudul “Kemampuan Inhibisi Ekstrak Daun Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Menggunakan Pelarut Etanol terhadap Pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus*” adalah benar hasil karya saya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan 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 ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Maret 2017

Yang menyatakan.

Ikatanti Ratna Anggraini

NIM. 131610101028

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Kemampuan Inhibisi Ekstrak Daun Kopi Robusta (*Coffea Canephora*) Menggunakan Pelarut Etanol terhadap Pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus*” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Jumat, 24 Maret 2017

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Penguji Ketua

Dr. drg. IDA Susilawati, M. Kes
196109031986022001

Pembimbing Utama

drg. Pujiana Endah Lestari, M. Kes
197608092005012002

Penguji Anggota

drg. Depi Praharani, M. Kes
196801221997022001

Pembimbing Pendamping

Dr. drg. Hj. Herniyati, M. Kes
195909061985032001

Mengesahkan
Dekan Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Jember,

drg. R. Rahardyan Parnaadji, M. Kes., Sp. Prost
196901121996011001

RINGKASAN

Kemampuan Inhibisi Ekstrak Daun Kopi Robusta (*Coffea Canephora*) Menggunakan Pelarut Etanol terhadap Pertumbuhan *Lactobacillus Acidophilus*;
Ikatanti Ratna Anggraini; 2017; 131610101028; 67 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Univeritas Jember.

Lactobacillus acidophilus adalah bakteri Gram positif yang merupakan salah satu penyebab karies gigi (Wiyarti, 2013). Karies merupakan suatu penyakit jaringan keras gigi yang penyebabnya multifaktorial, salah satunya adalah aktivitas metabolisme mikroorganisme yang dapat mengakibatkan terjadinya proses demineralisasi jaringan keras gigi (Tjahja, 2002). Di Indonesia, tingkat preventif karies oleh masyarakat masih tergolong rendah. Masyarakat lebih suka melakukan tindakan pengobatan daripada pencegahan terhadap penyakit karies. Pengobatanpun dilakukan apabila telah mencapai karies lanjut. Bakteri *Lactobacillus acidophilus* merupakan bakteri yang dominan pada karies lanjut. Salah satu pengobatan karies lanjut adalah *pulp capping*. Perawatan *pulp capping* dapat menggunakan bahan *pulp capping* yang mengandung antimikroba didalamnya. Namun efek samping hipersensitivitas dapat muncul akibat dari antimikroba sintetis ini. Sebagai alternatif terapi dapat dengan pemanfaatan bahan alam yaitu daun kopi robusta, yang memiliki kandungan alkaloid, saponin, flavonoid, dan polifenol yang memiliki efek antimikroba. Tujuan dalam penelitian ini adalah menganalisis kemampuan inhibisi ekstrak daun kopi robusta (*Coffea canephora*) menggunakan pelarut etanol terhadap pertumbuhan *L. acidophilus*. Apabila mampu menghambat, selanjutnya membuktikan bagaimana efek konsentrasi ekstrak daun kopi robusta (*Coffea canephora*) menggunakan pelarut etanol pada besarnya zona inhibisi pertumbuhan *L. acidophilus*.

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratoris dengan rancangan *the post test only control group design* menggunakan difusi sumuran (*well diffusion method*) yang menggunakan 8 sampel untuk setiap perlakuan, yang

dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Sedangkan pembuatan ekstrak daun kopi robusta menggunakan pelarut etanol dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember. Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimental laboratoris. Rancangan penelitiannya adalah *the post test-only group design*, yaitu membandingkan efek inhibisi ekstrak daun kopi robusta (*Coffea canephora*) menggunakan pelarut etanol pada kelompok perlakuan dan kontrol. Penelitian ini diawali dengan menuangkan MRS-A ke *petridish* sebanyak 25 ml dan diinokulasikan 0,5 ml suspensi *L. acidophilus* kemudian ditunggu hingga padat. Selanjutnya, pembuatan 5 lubang sumuran berdiameter 5 mm menggunakan *steril borer*, dan memasukkan 20 μ l ekstrak daun kopi robusta menggunakan pelarut etanol konsentrasi 100 gr/ml, 75 gr/ml, 50 gr/ml, 25 gr/ml, akuades steril (kontrol negatif). Kemudian dimasukkan ke dalam desikator dan inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, dilakukan pengukuran zona inhibisinya menggunakan jangka sorong *digital* yang dilakukan oleh tiga pengamat kemudian diambil rata-rata. Selanjutnya dilakukan analisis data menggunakan uji *Kolmogorov Smirnov* dan uji *Lavene*. Kemudian dilanjutkan uji statistik non parametrik *Kruskal Wallis* dan *Mann-Whitney* ($p < 0,05$) untuk menguji perbedaan median dua kelompok penelitian.

Data yang diperoleh menunjukkan terdistribusi normal namun tidak homogen. Kemudian setelah dilakukan uji statistik lanjutan, diketahui bahwa ekstrak daun kopi robusta menggunakan pelarut etanol konsentrasi 100 gr/ml secara signifikan ($p < 0,05$) memiliki kemampuan lebih besar dalam menghambat pertumbuhan *L. acidophilus* dibandingkan kelompok seduhan konsentrasi 75 gr/ml, 50 gr/ml, dan 25 gr/ml. Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun kopi robusta (*Coffea canephora*) menggunakan pelarut etanol memiliki kemampuan inhibisi terhadap pertumbuhan bakteri *L. acidophilus*.

SKRIPSI

**KEMAMPUAN INHIBISI EKSTRAK DAUN KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*) MENGGUNAKAN PELARUT ETANOL TERHADAP
PERTUMBUHAN
*Lactobacillus acidophilus***

Oleh

Ikatanti Ratna Angraini

NIM 131610101028

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : drg. Pujiana Endah Lestari, M. Kes
Dosen Pembimbing Pendamping : Dr. drg. Hj. Herniyati, M. Kes

PRAKATA

Puji syukur Alhamdulillah kehadirat Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Kemampuan Inhibisi Ekstrak Daun Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Menggunakan Pelarut Etanol terhadap Pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat 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 menyampaikan terima kasih kepada:

1. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M. Kes., Sp. Prost, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
2. drg. Pujiana Endah Lestari, M. Kes, selaku Dosen Pembimbing Utama, Dr. drg. Hj. Herniyati, M. Kes, selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah meluangkan waktu, pikiran, perhatian, dan kesabaran selama penyusunan skripsi ini.
3. Dr. drg. IDA Susilawati, M. Kes, selaku Dosen Penguji Ketua dan drg. Depi Praharani, M. Kes, selaku Dosen Penguji Anggota yang telah bersedia menguji dan memberikan masukan hingga terselesaikannya skripsi ini.
4. Dr. drg. Banun Kusumawardani, M. Kes, selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing penulis selama menjadi mahasiswa.
5. Kedua orang tuaku Romli Tito dan Asucik Kusmiati, terima kasih atas segalanya yang telah diberikan selama ini. Sungguh, saya bahagia telah menjadi bagian hidup mereka.
6. Adikku satu-satunya Dhia Silmi Danisha, terima kasih telah menjadi saudara terbaik selama ini.
7. Kakek, nenek, dan semua saudara-saudara yang telah memberikan doa dan semangatnya selama ini.

8. drg. Dyah Setyorini, M. Kes, yang telah banyak membantu selama penulis menjadi mahasiswa.
9. Teknisi Laboratorium Mikrobiologi, Pak Pin dan Mbak Indri.
10. Teknisi Laboratorium Biologi Farmasi, Mbak Parka dan Bu Widi.
11. Bapak Ir. Cherry Triwidiarto, M. Si yang begitu baik luar biasa dan menjadi satu-satunya jalan keluar dalam masalah identifikasi tanaman.
12. Pak Tosan, selaku petugas di Fakultas Pertanian yang telah sangat baik berkali-kali memberikan daun kopi gratis selama penulis melakukan penelitian.
13. Hesti Rasdi Setiawati, teman seperjuangan dalam suka maupun duka. Selalu bersedia menemani kemana pun penulis pergi selama penyusunan skripsi ini, serta menjadi teman terbaik dalam cerita segala sesuatu.
14. Teman-teman seperjuangan skripsi *Skripsweet*, Hesti, Okta, Ajeng, Ayung, dan Dessy.
15. Yoan Ayung Sagita, yang telah membantu dalam penyelesaian penggunaan aplikasi SPSS.
16. Mayriska Gibrania Anandhita dan Nazma Swastika Aries, yang telah membantu dalam penyusunan abstrak dalam skripsi ini. Kalian terbaik!
17. Teman-teman yang menyebut diri mereka Dewi-Dewi, Mayriska, Nana, dan Anis yang selalu membuat bahagia saat bertemu selama penyusunan skripsi ini.
18. Teman-teman KarbuGirls, Danti, Nazma, Nadia, Claudia, yang walaupun jauh namun selalu ada setiap saat.
19. Teman-teman KKN Kelompok 113, Fatimah, Randa, Festi, Oliv, Putri, Arief, Heri, Aldi, dan Adit yang meninggalkan kenangan indah selama KKN di tengah-tengah penulis menyusun skripsi.
20. Tim Hore, Hesti, Nora, Lijit, Novi, Pudew, Ajeng, Yas'a, Ria, Nurin, Ayung, Farah, Dienda, Dilla, Hendra, Iman, Melisa, Richa, Vita, Wahyu, Tiara, Syifa, Usnida, kalian luar biasa, sungguh!
21. Teman-teman Angkatan 2013 yang meninggalkan banyak sekali cerita di FKG. Kalian pasti akan mudah dirindukan.

22. Semua pihak yang telah membantu baik moril, materiil, serta memberikan kritik dan saran selama penyusunan skripsi ini yang tidak bisa disebutkan satu per satu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya, penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat. Aamiin.

Jember, Maret 2017

Penulis



DAFTAR ISI

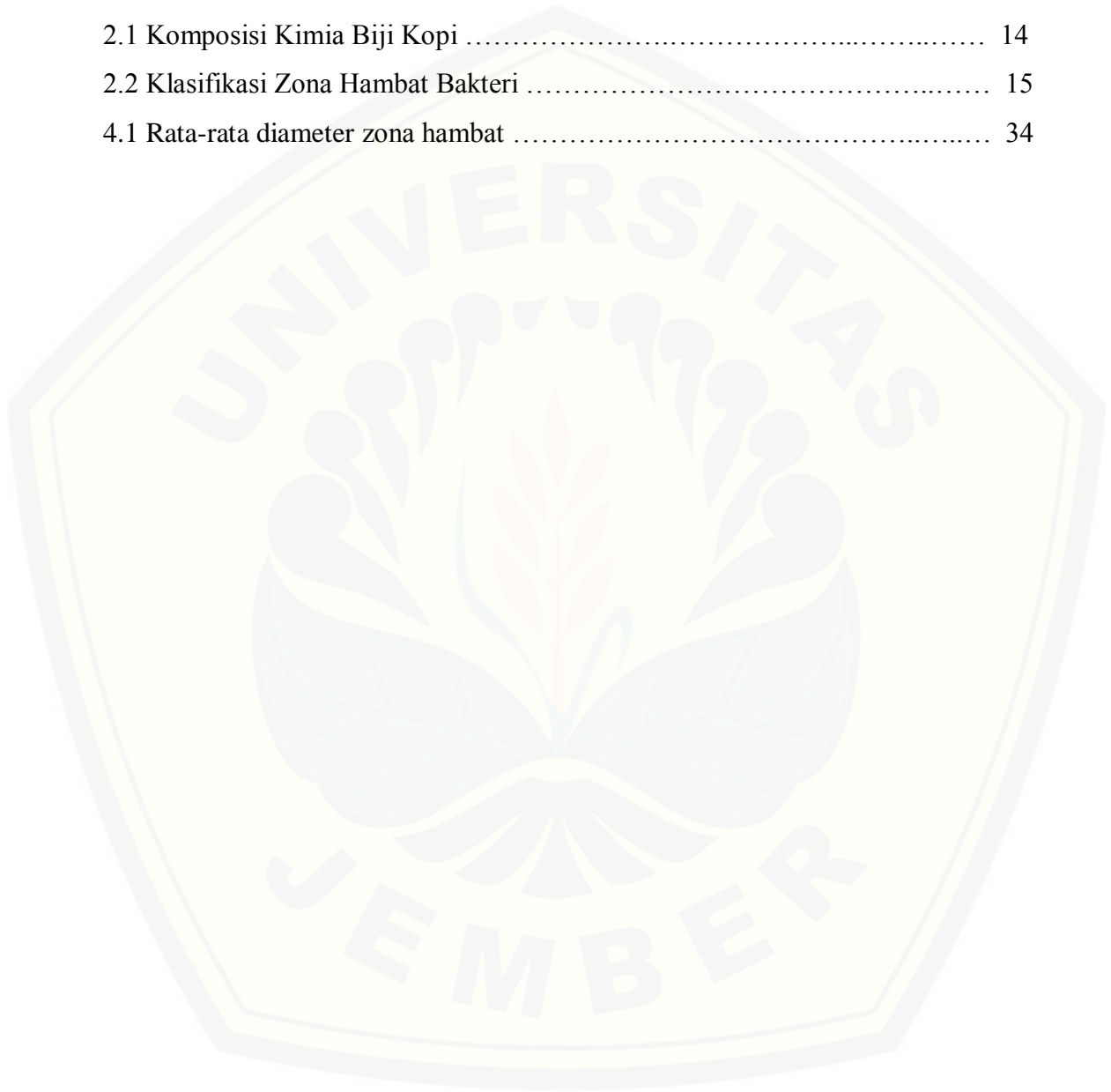
	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Karies Gigi	5
2.1.1 Pengertian Karies Gigi	5
2.1.2 Etiologi Karies Gigi	5
2.1.3 Mekanisme Terjadinya Karies Gigi	7
2.2 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	9
2.2.1 Klasifikasi <i>Lactobacillus acidophilus</i>	9
2.2.2 Karakteristik <i>Lactobacillus acidophilus</i>	9
2.2.3 Patogenitas <i>Lactobacillus acidophilus</i>	11

2.3 Kopi	12
2.3.1 Klasifikasi Kopi	12
2.3.2 Habitat Kopi	13
2.3.3 Kandungan Kopi	13
2.3.4 Daun Kopi Robusta	14
2.4 Antibakteri	15
2.5 Antibakteri Daun Kopi Robusta	16
2.5 Metode Ekstraksi Maserasi Etanol	17
2.7 Konsentrasi Larutan	18
2.8 Kerangka Konsep	20
2.9 Penjelasan Kerangka Konsep	21
2.10 Hipotesis	21
BAB 3. METODE PENELITIAN	22
3.1 Jenis Penelitian	22
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian	22
3.2.1 Waktu Penelitian	22
3.2.2 Tempat Penelitian	22
3.3 Identifikasi Penelitian	22
3.3.1 Variabel Bebas	22
3.3.2 Variabel Terikat	22
3.3.3 Variabel Terkendali	22
3.4 Definisi Operasional Penelitian	23
3.4.1 Zona Hambat Pertumbuhan <i>L. acidophilus</i>	23
3.4.2 Kemampuan Inhibisi Ekstrak Daun Kopi Robusta Menggunakan Pelarut Etanol.....	23
3.4.3 Ekstrak Daun Kopi Robusta Menggunakan Pelarut Etanol..	23
3.4.4 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	23
3.5 Sampel Penelitian	24
3.5.1 Kriteria Sampel	24

3.5.2 Kelompok Sampel	24
3.5.3 Besar Sampel	24
3.6 Alat dan Bahan	25
3.6.1 Alat Penelitian	25
3.6.2 Bahan Penelitian	26
3.7 Prosedur Penelitian	26
3.7.1 Tahap Persiapan	26
3.7.2 Tahap Perlakuan	29
3.7.3 Tahap Pengukuran	30
3.7.4 Analisis Data	31
3.8 Alur Penelitian	32
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	33
4.1 Hasil Penelitian	33
4.2 Pembahasan	36
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	42
DAFTAR PUSTAKA	43
LAMPIRAN	48

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Komposisi Kimia Biji Kopi	14
2.2 Klasifikasi Zona Hambat Bakteri	15
4.1 Rata-rata diameter zona hambat	34



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Diagram faktor penyebab karies	6
2.2 Proses terjadinya karies	8
2.3 <i>L. acidophilus</i>	10
2.4 <i>L. acidophilus</i> dilihat dengan mikroskop <i>scanning electron Theralac</i>	11
2.5 Kerangka Konsep	20
3.1 Pembuatan lubang sumuran menggunakan <i>steril borer</i>	28
3.2 Pemberian setiap kelompok perlakuan pada lubang sumuran	29
3.3 Cara pengukuran diameter zona hambat	30
3.4 Alur Penelitian	31
4.1 Hasil penelitian ekstrak daun kopi robusta menggunakan pelarut etanol terhadap pertumbuhan <i>L. acidophilus</i>	33
4.2 Diagram rata-rata zona hambat pertumbuhan <i>L. acidophilus</i>	34
4.3 Struktur kimia senyawa setanol	37
4.4 Struktur kimia senyawa saponin	37
4.5 Struktur kimia flavonoid	38
4.6 Struktur kimia polifenol	39
4.7 Struktur kimia alkaloid	40

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Analisis data	48
B. Foto hasil penelitian	55
C. Alat dan bahan penelitian	57
D. Prosedur penelitian	61
E. Identifikasi Bakteri <i>Lactobacillus acidophilus</i>	62
F. Rumus Penghitungan Jumlah Sampel	63
G. Surat Keterangan Identifikasi Bakteri	64
H. Surat Keterangan Identifikasi Tanaman	65
I. Surat Izin Penelitian Pembuatan Ekstrak	66
J. Surat Ekstraksi Daun Kopi Robusta Menggunakan Pelarut Etanol	67

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Lactobacillus acidophilus adalah bakteri Gram positif yang merupakan salah satu penyebab karies gigi (Wiyarti, 2013). Karies merupakan suatu penyakit jaringan keras gigi yang penyebabnya multifaktorial, salah satunya adalah aktivitas metabolisme mikroorganisme yang dapat mengakibatkan terjadinya proses demineralisasi jaringan keras gigi (Tjahja, 2002). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Soesilo *et al*, 2005, menunjukkan bahwa bakteri *S. mutans* berperan dalam permulaan (*initial*) terjadinya karies, sedangkan *L. acidophilus* berperan dalam proses perkembangan dan kelanjutan karies.

Penyakit gigi dan mulut merupakan masalah yang diderita oleh 90% penduduk Indonesia dan bersifat progresif. Masalah tersebut merupakan salah satu dari sepuluh keluhan terbanyak dan menduduki urutan pertama di antara penyakit lainnya, dimana yang paling sering ditemukan di masyarakat adalah karies gigi. Di Indonesia, tingkat preventif karies oleh masyarakat masih tergolong rendah, yaitu sebesar 43,4% (Balitbangkes, 2007). Masyarakat masih lebih suka melakukan tindakan pengobatan daripada pencegahan terhadap penyakit karies. Pengobatanpun dilakukan apabila telah mencapai karies lanjut.

Pada karies lanjut, salah satu pengobatan yang dapat dilakukan adalah *pulp capping*. Perawatan *pulp capping* sesuai definisi dari *American Association of Endodontists* (AAE) adalah suatu prosedur perawatan pulpa gigi menggunakan dental material seperti *calcium hydroxide* (Ca(OH)_2) atau mineral *trioxide aggregate* yang diletakkan di atas pulpa dalam keadaan cedera untuk merangsang terbentuknya dentin reparatif (Ingle, 2008). Pada perawatan *pulp capping* dapat menggunakan bahan *pulp capping* yang mengandung antimikroba didalamnya, yang bertujuan untuk mengeliminasi mikroorganisme sehingga proses penyembuhan akan semakin cepat. Namun efek samping berupa hipersensitivitas dapat muncul akibat dari antimikroba

sintetis ini. Sehingga diperlukan alternatif pilihan lain sebagai antimikroba dalam bahan tambahan *pulp capping*.

Salah satu alternatif dalam mengendalikan mikroorganisme penyebab karies adalah penggunaan tanaman yang memiliki khasiat antibakteri. Dewasa ini, pengobatan alternatif menggunakan tanaman berkhasiat banyak digunakan karena efek sampingnya yang relatif rendah dan mudah didapatkan (Rahmawati, 2012). Penggunaan tanaman kopi sebagai salah satu alternatif pengobatan telah banyak dilakukan oleh masyarakat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa biji kopi memiliki aktivitas antibakteri (Namboodiripad and Kori, 2009). Kopi memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri Gram positif dan negatif, termasuk *S. mutans* (Ferrazzano *et al*, 2009).

Di Indonesia, kopi merupakan komoditas perkebunan yang memegang peranan penting dalam bidang perekonomian (Ditjenbun, 2013). Pada tahun 2010 sentra penanaman kopi robusta rakyat di Jawa Timur adalah Kabupaten Malang (11.690 ha), Jember (5.608 ha), Lumajang (5.207 ha), Banyuwangi (3.751 ha) dan Blitar (1.652 ha) (Ardhana, 2012). Usaha tani kopi robusta di wilayah Jember menghasilkan produk kopi dengan kemampuan kompetisi yang baik. Hal tersebut dapat terjadi karena usaha tani kopi robusta di Jember dinilai memiliki kesesuaian dengan lahan dan sumber daya domestik sehingga lebih efisien (Soetrisno, 2010).

Daun kopi robusta diketahui memiliki kandungan antibakteri seperti biji kopi. Kandungan yang terdapat dalam daun kopi robusta tersebut antara lain alkaloid, saponin, flavonoid, dan polifenol (Rahmawati, 2012). Namun di Jember, setelah proses panen daun kopi hanya berakhir menjadi limbah. Sedangkan daun kopi selalu tersedia sepanjang tahun, tidak seperti bijinya yang memiliki masa panen tertentu. Sehingga dapat disimpulkan bahwa pemanfaatan daun kopi masih rendah, dan jarang dilakukan penelitian dibandingkan bijinya.

Penelitian daya antibakteri telah dilakukan sebelumnya, membuktikan bahwa ekstrak metanol daun kopi memiliki kandungan antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Eschericia coli* (Nayeem, 2011). Namun

belum adanya penelitian terhadap bakteri *Lactobacillus acidophilus*. Berdasarkan latar belakang tersebut, penulis ingin meneliti tentang daya antibakteri ekstrak daun kopi robusta (*Coffea canephora*) menggunakan pelarut etanol terhadap pertumbuhan *L. acidophilus* yang merupakan bakteri patogen penyebab timbulnya karies, dengan konsentrasi yang digunakan adalah 100 gr/dl, 75 gr/dl, 50 gr/dl, dan 25 gr/dl. Konsentrasi tersebut dipilih karena menurut penulis dapat mewakili konsentrasi tertinggi hingga terendah agar mampu melihat kemampuan antibakteri dari suatu bahan.

Pada penelitian ini penulis memilih metode ekstraksi maserasi karena prosedurnya mudah dilakukan, biaya yang dibutuhkan relatif murah, serta peralatan yang digunakan tergolong sederhana dan mudah didapatkan. Sedangkan pelarutnya etanol dipilih karena bahan ini memiliki kelebihan yaitu mampu mencegah rusaknya senyawa yang bersifat termolabil (Indraswari, 2008).

1.2 Rumusan Masalah

- 1.2.1 Apakah ekstrak daun kopi robusta (*Coffea canephora*) menggunakan pelarut etanol memiliki kemampuan inhibisi terhadap pertumbuhan *L. acidophilus*?
- 1.2.2 Jika memiliki kemampuan inhibisi, bagaimana efek konsentrasi ekstrak daun kopi robusta (*Coffea canephora*) menggunakan pelarut etanol pada besarnya zona inhibisi pertumbuhan *L. acidophilus*?

1.3 Tujuan

- 1.3.1 Menganalisis kemampuan inhibisi ekstrak daun kopi robusta (*Coffea canephora*) menggunakan pelarut etanol terhadap pertumbuhan *L. acidophilus*.
- 1.3.2 Membuktikan efek konsentrasi ekstrak daun kopi robusta (*Coffea canephora*) menggunakan pelarut etanol pada besarnya zona inhibisi pertumbuhan *L. acidophilus*.

1.4 Manfaat Penelitian

- 1.4.1 Dapat memberikan kontribusi terhadap ilmu pengetahuan dalam bidang kedokteran gigi tentang pengaruh ekstrak daun kopi robusta menggunakan pelarut etanol terhadap kemampuan inhibisi bakteri *L. acidophilus*.
- 1.4.2 Dapat digunakan sebagai bahan studi selanjutnya dalam memaksimalkan ekstrak daun kopi robusta menggunakan pelarut etanol, apabila penelitian ini dapat berfungsi sebagai inhibitor pertumbuhan bakteri *L. acidophilus*.
- 1.4.3 Dapat digunakan sebagai dasar untuk pengembangan bahan *pulp capping* yang mengandung antimikroba.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Karies Gigi

2.1.1 Pengertian Karies Gigi

Karies atau yang biasa disebut dengan gigi berlubang merupakan penyakit pada jaringan keras gigi yang ditandai oleh rusaknya enamel dan dentin, disebabkan oleh aktivitas metabolisme bakteri dalam plak yang mengakibatkan terjadinya demineralisasi akibat interaksi antara produk mikroorganisme, saliva, dan bagian-bagian tertinggal yang berasal dari makanan. Proses terjadinya karies membutuhkan waktu yang cukup lama, namun karena adanya akumulasi dari empat faktor yang berpengaruh, maka akan menimbulkan terjadinya karies. Empat faktor tersebut adalah mikroorganisme, *host*, makanan, dan waktu (Ramayanti, 2013).

Sedangkan menurut Sugito, 2000, karies merupakan suatu proses patologis yang terjadi karena adanya interaksi antara faktor-faktor di dalam mulut yaitu pejamu yang meliputi faktor gigi dan saliva, agen yaitu mikroorganisme, karbohidrat dan waktu. Namun juga bisa terjadi karena adanya faktor eksternal yaitu umur, jenis kelamin, perilaku kesehatan gigi dan mulut, pendidikan, sosial ekonomi dan ras.

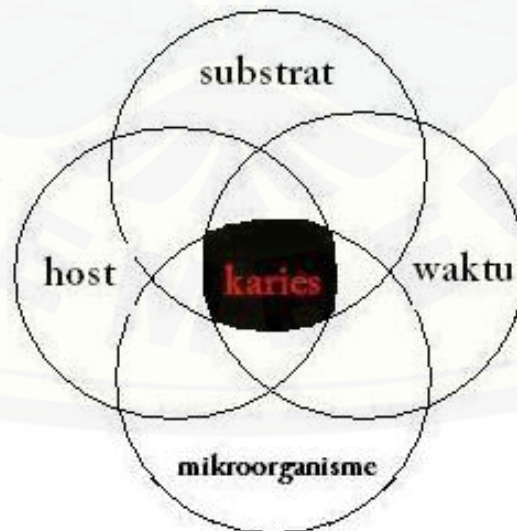
Menurut Schuurs, 1988, karies juga dapat didefinisikan sebagai suatu proses kronis regresif yang ditandai dengan larutnya mineral enamel sebagai akibat terganggunya keseimbangan antara enamel dan sekelilingnya yang disebabkan oleh pembentukan asam mikrobial dari substrat (medium makanan bagi bakteri), kemudian timbul destruksi komponen-komponen organik, akhirnya terjadi kavitas (pembentukan lubang).

2.1.2 Etiologi Karies Gigi

Etiologi dari terjadinya karies gigi adalah multifaktorial. Mikroorganisme sangat berperan penting dalam terjadinya proses karies gigi. *S. mutans* dan *Lactobacillus* merupakan bakteri penyebab utama karies yang dapat ditemukan pada plak gigi. Sedangkan plak merupakan suatu massa lunak terdiri dari kumpulan bakteri

yang tahan terhadap pelepasan dengan cara berkumur. Selanjutnya adalah *host*, yang sangat berpengaruh terhadap proses karies adalah morfologi dari gigi manusia. Gigi paling mudah terjadi karies adalah apabila terletak pada bagian yang sulit dibersihkan, sehingga sisa-sisa makanan dan plak dapat dengan mudah terakumulasi dan akhirnya menginisiasi terjadinya proses karies (Ramayanti, 2013).

Peran makanan dalam menyebabkan karies bersifat lokal, dimana setiap komponen dari makanan sangat berpengaruh terhadap derajat kariogeniknya. Sisa-sisa makanan dalam mulut, terutama karbohidrat merupakan substrat yang difermentasikan oleh bakteri untuk mendapatkan energi. Sukrosa dan glukosa dimetabolisme sedemikian rupa sehingga terbentuk polisakarida intrasel dan ekstrasel, sehingga bakteri melekat pada permukaan gigi. Selain itu sukrosa juga menyediakan cadangan energi bagi metabolisme kariogenik. Sukrosa oleh bakteri kariogenik dipecah menjadi glukosa dan fruktosa, lebih lanjut glukosa ini dimetabolisme menjadi asam laktat. Faktor terakhir yang berperan dalam terjadinya karies adalah waktu. Karies sebenarnya berlangsung dalam waktu yang relatif lama dan bertahap, dengan ditandai adanya proses demineralisasi dan remineralisasi (Ramayanti, 2013). Secara umum, etiologi karies dapat dilihat pada Gambar 2.1.

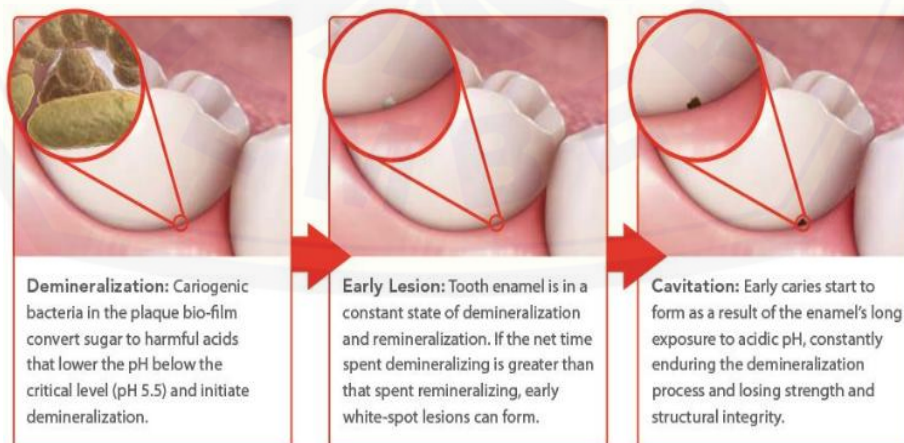


Gambar 2.1 Diagram faktor penyebab karies (Ramayanti, 2013).

2.1.3 Mekanisme Terjadinya Karies Gigi

Karies gigi dapat terjadi karena adanya empat faktor utama yang harus saling berinteraksi yaitu *host*, *agent*, substrat dan waktu. Adanya sisa makanan yang mengandung karbohidrat di dalam mulut juga memiliki peran yang sangat penting dalam proses terjadinya karies, karena akan mengalami fermentasi oleh flora normal rongga mulut dan menjadi asam piruvat serta asam laktat melalui proses glikolisis. Beberapa jenis karbohidrat makanan misalnya sukrosa dan glukosa dapat difermentasikan oleh bakteri tertentu dan membentuk asam sehingga pH plak akan menurun sampai di bawah 5 dalam waktu 1-3 menit. Selanjutnya akan dimulai dengan adanya plak beserta bakteri penyusunnya. Dalam proses terjadinya karies, mikroorganisme *Streptococcus* dan *Lactobacillus* mempunyai peranan yang sangat besar (Sari, 2014).

Proses karies gigi diperkirakan sebagai perubahan dinamik antara tahap demineralisasi dan remineralisasi. Proses demineralisasi merupakan hilangnya sebagian atau keseluruhan dari kristal enamel. Demineralisasi terjadi karena penurunan pH oleh bakteri kariogenik selama metabolisme yang menghasilkan asam organik pada permukaan gigi dan menyebabkan ion kalsium, fosfat dan mineral yang lain berdifusi keluar enamel membentuk lesi di bawah permukaan. Gambaran singkat mengenai terjadinya karies dapat dilihat dalam Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Proses terjadinya karies (*Alliance for a Cavity Free-Future*, 2013).

Sedangkan proses remineralisasi adalah proses pengembalian ion-ion kalsium dan fosfat yang terurai keluar enamel. Remineralisasi terjadi jika asam pada plak dinetralkan oleh saliva, sehingga terjadi pembentukan mineral baru yang dihasilkan oleh saliva seperti kalsium dan fosfat menggantikan mineral yang telah hilang di bawah permukaan enamel. Proses remineralisasi dan demineralisasi terjadi secara bergantian di dalam rongga mulut selama mengkonsumsi makanan dan minuman (Sari, 2014).

Lesi awal karies merupakan tahap permulaan proses terjadinya karies. Pada proses awal terjadinya karies dimulai pada *pit* dan *fissure*, interproksimal gigi dan bagian servikal gigi, dari lapisan enamel atau sementum kemudian dapat berlanjut ke bagian gigi yang lebih dalam. Dengan adanya siklus demineralisasi dan remineralisasi yang terbatas pada enamel, maka dikenal sebagai bercak putih (*white spot*). Bercak putih adalah suatu daerah yang kepadatannya berkurang pada bagian bawah permukaan enamel, sedangkan bagian atas atau luar lapisan enamel masih utuh. Hal ini disebabkan karena terjadinya pelepasan ion kalsium dan fosfat dari enamel. Fase awal karies menggambarkan fase paling dini karies gigi yang dapat kembali normal (*reversed*) atau tidak berkembang (*arrested*) atau berkembang menjadi suatu kavitas (progresif) (Sari, 2014).

Proses karies yang dimulai dengan adanya lesi tersebut diinisiasi oleh *Streptococcus* dengan membentuk asam sehingga menghasilkan pH yang lebih rendah. *Streptococcus* memiliki sifat-sifat tertentu yang memungkinkan untuk memegang peranan utama dalam proses karies gigi, yaitu memfermentasi karbohidrat menjadi asam sehingga mengakibatkan pH mulut turun, membentuk dan menyimpan polisakarida intraseluler dari berbagai jenis karbohidrat, simpanan ini dapat dipecahkan kembali oleh mikroorganisme tersebut bila karbohidrat eksogen kurang, sehingga dengan demikian akan menghasilkan asam secara terus-menerus (Cura *et al*, 2012).

Selanjutnya, bakteri *L. acidophilus* mengambil perannya dalam terjadinya proses karies lanjut. *L. acidophilus* dianggap bakteri penginvansi sekunder, bukan

pemicu dalam proses invasi karies gigi karena *L. acidophilus* nampak setelah lesi karies terbentuk. *L. acidophilus* merupakan bakteri penghasil asam laktat yang produktif dan bersifat toleran terhadap asam. Pada orang dewasa, *L. acidophilus* mendominasi pada lesi karies lanjut, bahkan jumlahnya melebihi *S. mutans*. Bakteri *L. acidophilus* tidak dapat melekat secara langsung pada enamel gigi, namun bekerjasama dengan bakteri *S. mutans*, pencetus pembuatan asam laktat yang bertanggung jawab dalam proses demineralisasi enamel gigi (Cura *et al*, 2012). Jika lesi awal karies tersebut mengalami demineralisasi secara terus-menerus dan didukung dengan adanya aktivitas bakteri *L. acidophilus*, maka lesi tersebut akan berlanjut menuju ke dentin membentuk kavitas yang tidak dapat kembali normal (irreversibel) dan menginfeksi jaringan pulpa sehingga menyebabkan rasa nyeri, nekrosis pulpa, kehilangan gigi dan infeksi sistemik (Cura *et al*, 2012).

2.2 *Lactobacillus acidophilus*

2.2.1 Klasifikasi *Lactobacillus acidophilus*

Klasifikasi dari bakteri *L. acidophilus* adalah sebagai berikut:

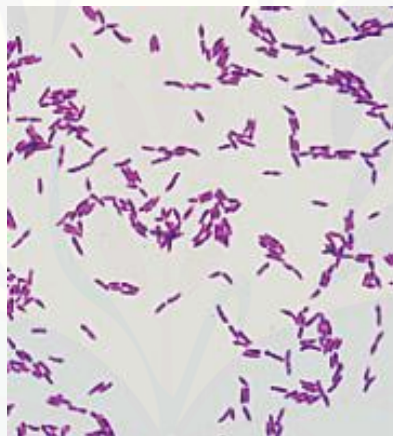
Kingdom	: <i>Monera</i>
Divisio	: <i>Firmicutes</i>
Class	: <i>Bacilli</i>
Ordo	: <i>Lactobacillales</i>
Family	: <i>Lactobacillaceae</i>
Genus	: <i>Lactobacillus</i>
Species	: <i>Lactobacillus acidophilus</i>

L. acidophilus termasuk dalam kingdom Monera, yang merupakan satu-satunya kingdom organisme prokariotik. Bakteri ini juga termasuk dalam divisi *Firmicutes*, yang memiliki spesies menghasilkan endospora. *L. acidophilus* berada dalam ordo *Lactobacillales*, meliputi spesies yang ditemukan di tanah, air, tanaman, dan hewan, bahkan juga dapat dimanfaatkan dalam berbagai fermentasi. *Family* dari *Lactobacillaceae*, dimana salah satunya adalah *L. acidophilus* merupakan *family* dari

bakteri asam laktat, yang semuanya mampu menghasilkan laktase, dan memecah karbohidrat dengan struktur yang kompleks menjadi gula sederhana (Samarayanake, 2012).

2.2.2 Karakteristik *Lactobacillus acidophilus*

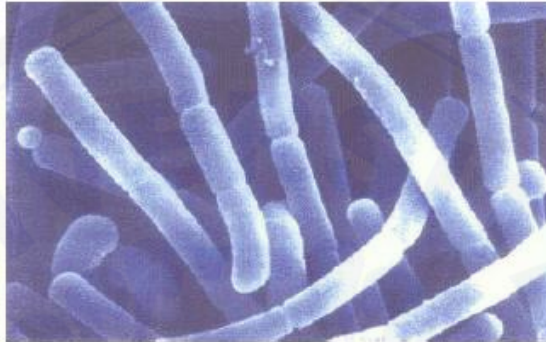
L. acidophilus mampu melekat pada permukaan enamel, baik secara langsung maupun melalui saliva (Ahumada *et al*, 2003). Salah satu faktor yang dapat mempengaruhi laju *L. acidophilus* pada saliva adalah adanya asupan karbohidrat. Sejumlah besar *Lactobacillus* yang terisolasi dari lidah, plak gigi dan air liur menunjukkan sifat hidrofobik dari tingkat sedang sampai tinggi (Badet, 2008).



Gambar 2.3 *L. acidophilus* (Todar, 2012).

Terdapat beberapa jenis dari bakteri asam laktat, salah satunya adalah *L. acidophilus*. *Lactobacillus* antara satu dan lainnya memiliki habitat, morfologi, maupun karakteristik yang berbeda. Walaupun demikian, secara umum bakteri asam laktat merupakan bakteri Gram positif yang berbentuk batang panjang, dan terkadang hampir membulat, dengan ukuran 0,5-1,2 x 1,0-10,0 μm . *L. acidophilus* merupakan bakteri anaerob fakultatif, yaitu dapat hidup pada lingkungan tanpa oksigen, namun juga mampu bertahan pada kadar oksigen yang rendah. Sedangkan suhu udara yang mempengaruhi bakteri tersebut untuk tumbuh dengan baik yaitu 30°C (Hemmes *et*

al, dalam Nawaekasari, 2012). Gambaran *L. acidophilus* dapat dilihat dalam Gambar 2.1 dan 2.2 yang memperlihatkan bentukan batang dan berwarna ungu yang menandakan bahwa bakteri tersebut merupakan Gram positif.



Gambar 2.4 *L. acidophilus* dilihat dengan mikroskop *scanning electron Theralac* (Hemmes *et al* dalam Nawaekasari, 2012).

2.2.3 Patogenitas Bakteri *L. acidophilus*

a. Kariogenik dari Bakteri *L. acidophilus*

Sifat perlekatan dari *L. acidophilus* menunjukkan bahwa mereka mampu beradaptasi dengan beragam kultur sel. Permukaan sel *L. acidophilus* memiliki *S-layer*. Lapisan protein ini memiliki struktur kristal dan berperan sebagai permukaan yang hidrofobik. Bakteri ini mampu beradaptasi menggunakan permukaan hidrofobik tersebut apabila terjadi perubahan lingkungan, misalnya terhadap pH. Beberapa penulis telah mempelajari tingkat hidrofobik dari *L. acidophilus* yang diisolasi dari plak gigi, lidah, gingival dan saliva pada pasien dengan karies. Sejumlah besar *L. acidophilus* tersebut menunjukkan sifat hidrofobik dari tingkatan sedang hingga tinggi. Walaupun hanya sedikit yang diketahui tentang perlekatan *L. acidophilus*, namun yang paling banyak diketahui adalah kemampuannya dalam menghasilkan asam, dan tumbuh serta bertahan dalam lingkungan yang asam. Bakteri ini memiliki dua tipe; beberapa spesies menggunakan fermentasi homolaktik yang hanya menghasilkan asam laktat, dan lainnya menggunakan fermentasi heterofermentatif,

yang mampu menghasilkan asam laktat, CO₂, asam asetat atau etanol (Badet *et al*, 2008).

b. Patogenesis *L. acidophilus* pada Karies Lanjut

L. acidophilus terisolasi banyak di karies dentin (karies lanjut), sehingga dapat dikatakan bahwa bakteri tersebut lebih berperan pada proses karies lanjut. Patogenitas dari bakteri ini yaitu mampu dengan cepat memetabolisme karbohidrat menjadi asam dan bertahan pada lingkungan yang memiliki pH rendah. *L. acidophilus* mampu mengakibatkan pH plak menurun hingga kurang dari 5 dalam waktu 1-3 menit. Hal tersebut pada akhirnya akan terjadi secara berulang, yang kemudian mengakibatkan demineralisasi permukaan gigi hingga akan dimulainya proses karies (Kidd *et al*, 2012). Selain kemampuannya dalam metabolisme karbohidrat maupun bertahan dalam pH yang sangat rendah, *L. acidophilus* juga memiliki kemampuan dalam memproduksi polisakarida ekstraseluler (EPS), yang nantinya akan berperan dalam pembentukan matriks plak, walaupun perlekatannya pada gigi tidak sekuat yang dihasilkan *S. mutans* (Badet *et al*, 2008).

2.3 Kopi

2.3.1 Klasifikasi Kopi

Kopi merupakan suatu komoditas perkebunan yang memegang peranan penting dalam perekonomian nasional. Di Indonesia, terdapat empat jenis kopi yang dikenal oleh masyarakat, yaitu arabika, robusta, liberika, dan ekselsa. Namun tidak semua jenis kopi tersebut memiliki nilai jual yang tinggi, dimana kelompok kopi yang dikenal memiliki nilai ekonomis dan mampu diperdagangkan secara komersial adalah arabika dan robusta. Klasifikasi dari tanaman kopi jenis robusta yaitu:

Kingdom : *Phylum*
Divisio : *Spermathophyta*
Sub Divisio : *Angiospermae*
Kelas : *Dicotyledoneae*
Ordo : *Rubiales*

Genus : *Coffea*
Spesies : *Coffea canephora* (Halevi, 2011).

2.3.2 Habitat Kopi

Pertumbuhan kopi dalam bidang pertanian sangat dipengaruhi oleh keadaan iklim dan tanah. Tanaman kopi sebaiknya ditanam pada tanah yang memiliki kandungan zat hara dan organik tinggi. Sifat tanah tersebut dapat dijumpai pada dataran tinggi Indonesia. Rata-rata pH tanah yang dianjurkan adalah 5-7. Sedangkan salah satu faktor iklim yang berpengaruh pada pertumbuhan tanaman kopi adalah curah hujan. Untuk jenis arabika, curah hujan yang bisa ditolerir adalah sekitar 1000-1500 mm/tahun, sedangkan robusta maksimum 2000 mm/tahun (Panggabean, 2011). Namun saat ini komoditas kopi robusta sedang menguasai lahan pertanian di Indonesia, dimana lebih dari 90% areal pertanian kopi terdiri dari jenis robusta. Hal tersebut dikarenakan kopi robusta memiliki sifat yang lebih mudah dalam hal perawatan daripada arabika (Rahardjo, 2012).

2.3.3 Kandungan Kopi

Komposisi yang terdapat dalam kopi berbeda-beda, hal tersebut tergantung pada tipe kopi, tanah yang digunakan dalam proses penanaman, bahkan cara pengolahannya. Tanaman kopi banyak mengandung senyawa kimia yang sangat berpengaruh pada tubuh, misalnya: kafein, trigonelin, glukosa, protein, teofilina, asam klorogenat, tanin, mineral, dan komponen volatil (Thom, 2007). Namun struktur kimia yang paling penting terdapat dalam kopi adalah kafein dan kafeol. Kafein merupakan alkaloid turunan dari *methyl xanthine 1,3,7 trimethyl xanthine*. Kafein adalah basa *monocidic* lemah dan dapat terurai dengan adanya proses penguapan (Ridwansyah, 2003). Kafein di dalam kopi robusta komposisinya 1,6-2,4%, yang bermanfaat sebagai peningkatan resistensi sistem imun dalam melawan bakteri dengan cara meningkatkan konsentrasi sel imunokompeten serta memperkuat aktivitas lisozim (Ramanaviciene *et al*, 2003). Sedangkan kafeol merupakan salah

satu zat penghasil cita rasa dan aroma dari kopi tersebut (Ridwansyah, 2003). Perbandingan komposisi kimia antara kopi arabika, robusta hijau dan disangrai, serta bubuk kopi instan dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Komposisi Kimia Biji Kopi

Komponen	Arabika Green	Arabika roasted	Robusta Green	Robusta roasted	Bubuk kopi instan
Mineral	3.0-4.2	3.5-4.5	4.0-4.5	4.6-5.0	9.0-10.0
Kaffein	0.9-1.2	1.0	1.6-2.4	2.0	4.5-5.1
Trigonelline	1.0-1.2	0.5-1.0	0.6-0.75	0.3-0.6	-
Lemak	12.0-18.0	14.5-20.0	9.0-13.0	11.0-16.0	1.5-1.6
Total Chlorogenic Acid	5.5-8.0	1.2-2.3	7.0-10.0	3.9-4.6	5.2-7.4
Asam Alifatis	1.5-2.0	1.0-1.5	1.2-1.5	1.0-1.5	-
Oligosakarida	6.0-8.0	0-3.5	5.0-7.0	0-3.5	0.7-5.2
Asam Amino	2.0	0		0	0
Protein	11.0-13.0	13.0-15.0		13.0-15.0	16.0-21.0
Humic Acids	-	16.0-17.0		16.0-17.0	15.02

Sumber: Clarke dan Macrae dalam Ridwansyah, 2003.

Selain itu, dalam biji kopi juga terdapat kandungan asam kloragenat atau yang bisa disebut juga sebagai *5-caffeoylquinic acid* yaitu salah satu kandungan kopi yang jumlahnya hampir sama besar dengan kafein (Thom, 2007). Di dalam kopi juga terdapat kandungan alkaloid. Dalam satu cangkir kopi saja terdapat sekitar 800 senyawa aromatik, maka dari itu kopi merupakan salah satu minuman dengan kandungan kimia yang cukup kompleks (Taufik, 2008).

2.3.4 Daun Kopi Robusta

Daun kopi robusta memiliki bentuk bulat telur, dimana bagian ujungnya sedikit meruncing hingga bulat. Daun kopi robusta dapat dijumpai pada bagian

batang, cabang dan ranting-ranting yang tersusun secara berdampingan. Pada batang atau cabang-cabang yang tumbuhnya tegak lurus, susunan pasangan daun itu berselang-seling pada ruas-ruas berikutnya. Sedangkan daun yang tumbuh pada ranting dan cabang yang mendatar, daun tersebut terletak pada bidang yang sama, tidak berselang-seling. Setelah dilakukan penelitian, diketahui bahwa daun kopi robusta mengandung alkaloid, saponin, flavonoid, dan polifenol (Rahmawati, 2012).

Aktivitas antioksidan paling tinggi adalah pada daun ke-3 dan 4 yang diproses secara segar dan dikeringkan dalam *cabinet drier* yaitu 70,6375% dan 69,6310%. Sedangkan total polifenol yang paling tinggi juga dimiliki oleh daun ke-3 dan 4 yang diproses secara segar dan dikeringkan dalam *cabinet drier* yaitu 10,0120% dan 11,5305%. Sedangkan kafein yang paling rendah dimiliki oleh daun ke-3 yang diproses secara segar dan dikeringkan dalam *cabinet drier* yaitu 0,12% (Khotimah, 2014).

2.4 Antibakteri

Aktivitas antibakteri diperoleh dengan cara mengukur zona inhibisi, yaitu zona bening yang terbentuk di sekitar lubang sumuran. Hal tersebut menunjukkan bahwa bakteri tidak dapat tumbuh di sekitar lubang tempat pemberian filtrat. Zona bening yang terbentuk tersebut diukur menggunakan jangka sorong (Rokhman, 2007). Menurut Suryawiria, 2005, klasifikasi zona inhibisi adalah sebagai berikut:

Tabel 2.2 Klasifikasi Zona Inhibisi Bakteri

No.	Diameter Zona Bening (mm)	Respon Hambatan
1	< 5	Lemah
2	5-10	Sedang
3	10-19	Kuat
4	> 20	Sangat kuat

Sumber: Suryawiria, 2005.

Antibakteri yang memiliki daya inhibisi dapat dibedakan berdasarkan mekanisme kerjanya, yaitu:

a. Antibakteri yang Menghambat Sintesis Dinding Sel

Mekanisme ini menyerang pada dinding sel bakteri. Dinding sel mengandung polimer kompleks peptidoglikan yang khas secara kimiawi, terdiri dari polisakarida dan polipeptida. Polisakarida tersebut biasanya mengandung gula amino *N*-asetilglukosamin dan asam asetimuramat.

b. Antibakteri yang Mengakibatkan Perubahan Permeabilitas Membran Sel

Sitoplasma sel hidup diikat oleh membran sitoplasma, yang bekerja sebagai barrier permeabilitas selektif, berfungsi sebagai transpor aktif sehingga mengontrol komposisi internal sel. Jika terdapat gangguan fungsional pada membran sitoplasma, maka makromolekul dan ion dapat keluar dari sel sehingga menyebabkan kerusakan atau kematian sel.

c. Antibakteri yang Menghambat Sintesis Protein

Bakteri memiliki ribosom 70S, sedangkan sel mamalia mempunyai ribosom 80S. Subunit setiap tipe ribosom, komposisi kimia, dan spesifisitas fungsionalnya cukup berbeda untuk menjelaskan mengapa obat antibiotik dapat menghambat sintesis protein pada ribosom bakteri tanpa berpengaruh besar pada ribosom mamalia.

d. Antibakteri yang Menghambat Sintesis Asam Nukleat Sel

Mekanisme ini bekerja dengan cara menghambat sintesis RNA atau DNA dari bakteri. Terdapat obat yang berikatan pada *RNA polimerase dependen-DNA* bakteri, juga ada yang menghambat *DNA-girase* (Brooks *et al*, 2007).

2.5 Antibakteri Daun Kopi Robusta

Daun kopi robusta diketahui memiliki kandungan zat aktif antara lain: alkaloid, saponin, flavonoid, dan polifenol (Rahmawati, 2012). Menurut penelitian Nayeem, *et al.*, 2011 diketahui bahwa daun kopi mengandung antimikroba terhadap *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Eschericia coli*, *Klebsiella pneumonia* and *Candida albicans*. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Hurria, 2005,

ditemukan fakta bahwa alkaloid dapat menghambat pertumbuhan *S. mutans* pada konsentrasi tertentu. Sedangkan saponin memiliki manfaat dalam menghambat pertumbuhan mikroba dengan cara berinteraksi dengan membran sterol (Suwandi, 2012). Saponin juga mampu menurunkan tegangan permukaan sehingga mengakibatkan naiknya permeabilitas atau kebocoran sel dan mengakibatkan senyawa intraseluler akan keluar (Nuria dkk, 2009).

Kandungan selanjutnya adalah flavonoid yang berfungsi dalam menghambat pertumbuhan dari mikroorganisme, karena flavonoid mampu membentuk senyawa kompleks dengan protein melalui ikatan hidrogen. Flavonoid sebagai antimikroba dapat menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom sebagai hasil interaksi antara senyawa tersebut dengan DNA bakteri (Suwandi, 2012). Flavonoid menghambat pada sitokrom C reduktase sehingga pembentukan metabolisme pun terhambat (Chusnie dan Lamb, 2005). Sedangkan senyawa yang terakhir yaitu polifenol, berfungsi sebagai antibakteri dengan cara mengubah permeabilitas sel mikroorganisme dan memungkinkan hilangnya makromolekul dalam sel. Senyawa polifenol juga dapat berinteraksi dengan protein membran, menyebabkan perubahan struktur dan fungsionalnya (Suwandi, 2012).

2.6 Metode Ekstraksi Maserasi Menggunakan Pelarut Etanol

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Siplisia yang diekstrak mengandung senyawa aktif yang dapat larut dan senyawa yang tidak larut seperti serat, karbohidrat, protein, dan lain-lain. Senyawa aktif yang terdapat dalam berbagai simplisia dapat digolongkan ke dalam golongan minyak atsiri, alkaloid, dan flavonoid, dengan diketahuinya senyawa aktif yang dikandung simplisia maka akan mempermudah pemisahan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat (Ditjen POM, 2000).

Metode ekstraksi yang dilakukan dari bahan-bahan nabati ada beragam, salah satunya adalah maserasi. Maserasi merupakan metode sederhana yang paling banyak

digunakan. Cara ini sesuai, baik untuk skala kecil maupun skala industri. Metode ini dilakukan dengan memasukkan serbuk tanaman dan pelarut yang sesuai ke dalam wadah *inert* yang tertutup rapat pada suhu kamar. Proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan. Kerugian utama dari metode maserasi ini adalah memakan banyak waktu dan pelarut yang digunakan cukup banyak. Namun di sisi lain, metode maserasi dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termolabil. Metode maserasi tersebut juga memiliki prosedur yang mudah untuk dilakukan, dan biaya yang dibutuhkan murah.

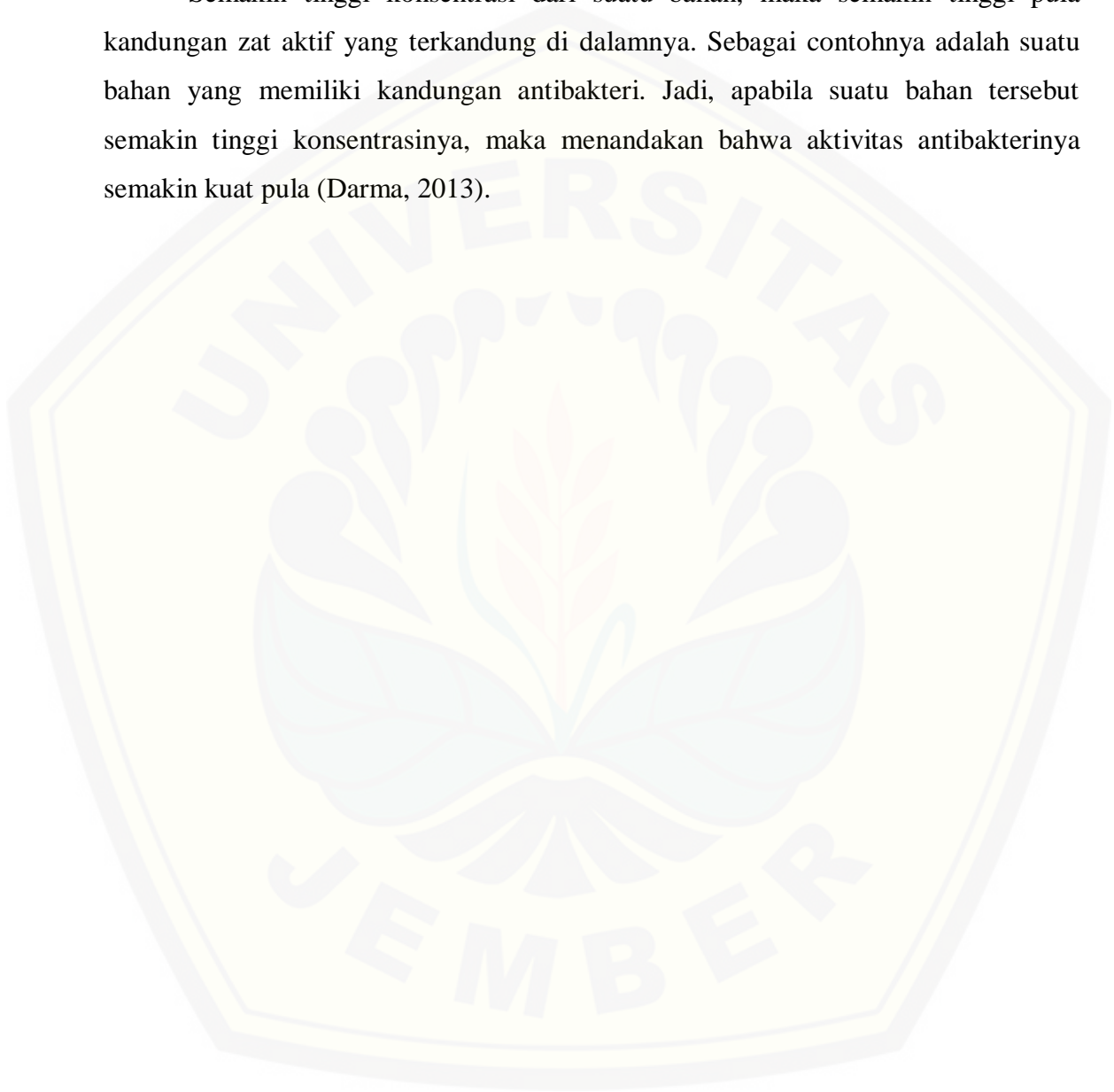
Pelarut yang dapat digunakan dalam metode maserasi umumnya bersifat non polar. Hal tersebut dikarenakan ketika simplisia direndam, cairan pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam sel yang penuh dengan zat aktif. Kemudian menyebabkan bercampurnya antara zat aktif dan pelarut tersebut. Sementara pelarut yang berada di luar sel belum terisi zat aktif. Hal tersebut mengakibatkan adanya perbedaan konsentrasi zat aktif di dalam dan di luar sel, kemudian akan menimbulkan difusi, dimana larutan yang terpekat akan didesak keluar berusaha mencapai keseimbangan konsentrasi antara zat aktif di dalam dan di luar sel. Proses keseimbangan ini akan berhenti, setelah terjadi keseimbangan konsentrasi. Dimana salah satu pelarut non polar yang dapat digunakan tersebut adalah etanol (Yulianti, 2014).

2.7 Konsentrasi Larutan

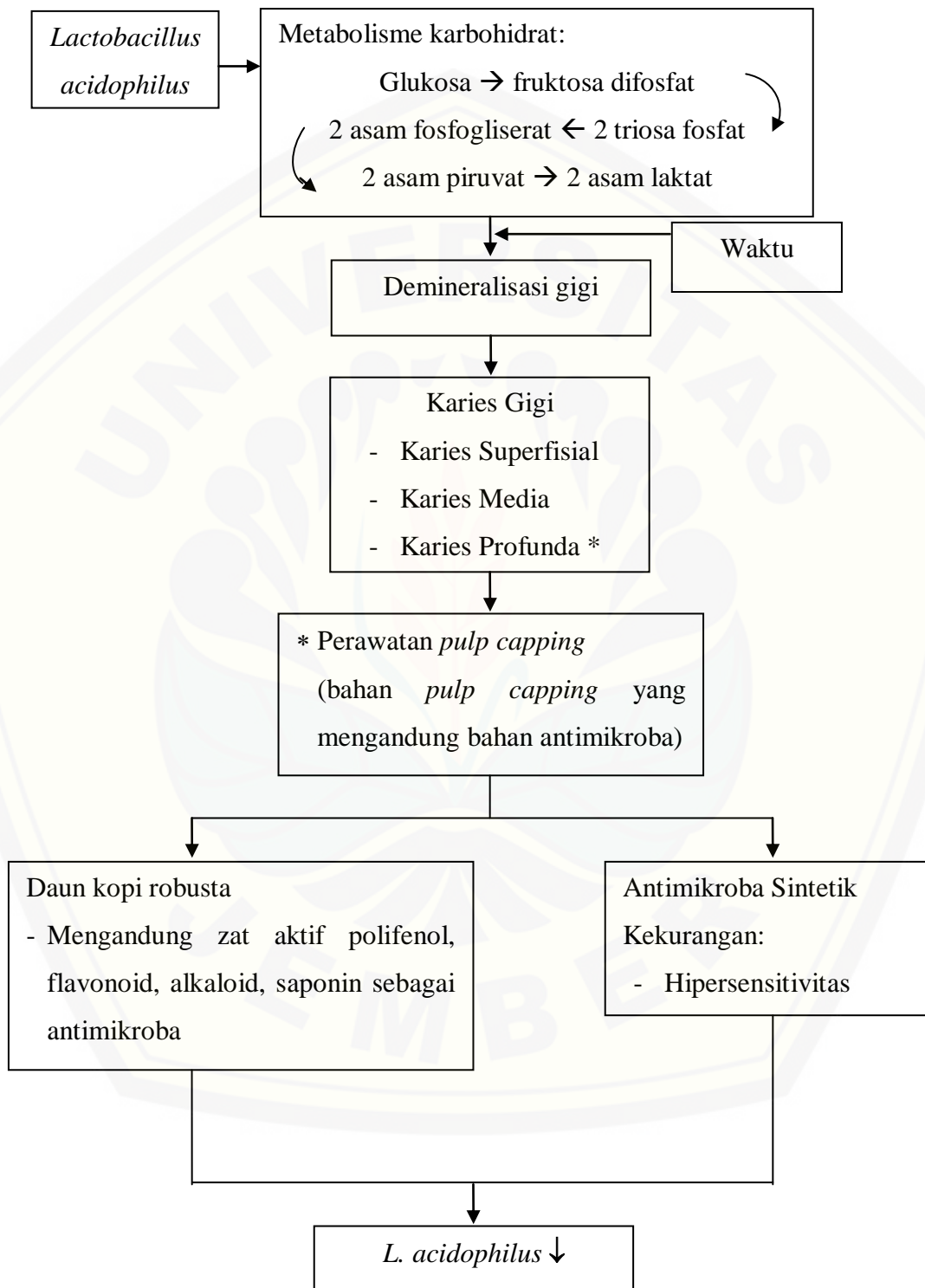
Larutan merupakan campuran zat-zat terlarut dan pelarut yang komposisinya merata (homogen). Suatu larutan dapat terdiri dari satu zat terlarut atau lebih dan satu macam pelarut, tetapi umumnya terdiri dari satu jenis zat terlarut dan satu pelarut. Berhubungan dengan larutan, terdapat istilah konsentrasi larutan yang mengatur mengenai jumlah pelarut dan terlarut. Konsentrasi larutan adalah jumlah zat terlarut dalam setiap satuan larutan atau pelarut. Konsentrasi larutan merupakan suatu label

larutan, agar larutan tersebut bisa memberikan gambaran atau informasi tentang perbandingan jumlah zat terlarut dan jumlah pelarutnya (Rusman *et al*, 2010).

Semakin tinggi konsentrasi dari suatu bahan, maka semakin tinggi pula kandungan zat aktif yang terkandung di dalamnya. Sebagai contohnya adalah suatu bahan yang memiliki kandungan antibakteri. Jadi, apabila suatu bahan tersebut semakin tinggi konsentrasinya, maka menandakan bahwa aktivitas antibakterinya semakin kuat pula (Darma, 2013).



2.8 Kerangka Konsep



Gambar 2.5 Kerangka Konsep

2.9 Penjelasan Kerangka Konsep

Adanya kolonisasi *Lactobacillus acidophilus* dan mikroba plak lainnya pada plak gigi akan menghasilkan asam laktat melalui proses glikolisis. Apabila asam ini mengenai gigi dapat menyebabkan demineralisasi. Proses sebaliknya, remineralisasi dapat terjadi apabila pH telah dinetralkan. Namun jika demineralisasi terus berlanjut, maka akan terjadi proses karies. Proses karies superfisial terjadi dengan keadaan pH <5,5. Namun apabila proses demineralisasi masih berlangsung, maka karies akan memasuki tahap lanjut dan bakteri *L. acidophilus* akan berperan besar di dalamnya, dengan keadaan pH mencapai <4,5. Secara perlahan mikroba yang sensitif terhadap pH <4,5 akan mati. Sedangkan *L. acidophilus* mampu bertahan hingga pH 2,2.

Apabila karies telah memasuki tahap lanjut, salah satu perawatan yang dapat dilakukan adalah *pulp capping*. Pada perawatan *pulp capping* dapat menggunakan bahan *pulp capping* yang mengandung antimikroba di dalamnya. Namun efek samping berupa hipersensitivitas dapat muncul akibat dari antimikroba sintetis ini. Maka dari itu perlu mengembangkan alternatif pilihan antimikroba yang dapat digunakan sebagai bahan campuran bahan *pulp capping*. Bahan alam yang dapat digunakan tersebut salah satunya adalah daun kopi robusta. Alasan pemilihan daun kopi robusta tersebut dikarenakan adanya kandungan senyawa aktif polifenol, saponin, alkaloid, dan flavonoid yang masing-masing memiliki efek antimikroba. Dengan adanya kemampuan tersebut, maka daun kopi robusta diharapkan mampu menurunkan jumlah *L. acidophilus*.

2.10 Hipotesis

1. Ekstrak daun kopi robusta (*Coffea canephora*) menggunakan pelarut etanol memiliki kemampuan inhibisi terhadap pertumbuhan bakteri *L. acidophilus*.
2. Konsentrasi 100 gr/dl ekstrak daun kopi robusta (*Coffea canephora*) menggunakan pelarut etanol memiliki daya inhibisi paling besar terhadap pertumbuhan *L. acidophilus*.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimental laboratoris. Rancangan penelitiannya adalah *the post test-only group design*, yaitu membandingkan efek inhibisi ekstrak daun kopi robusta (*Coffea canephora*) menggunakan pelarut etanol pada kelompok perlakuan setelah diberi tindakan dan kontrol.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

3.2.1 Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan November-Desember 2016.

3.2.2 Tempat Penelitian

Pembuatan ekstrak daun kopi robusta menggunakan pelarut etanol dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember. Sedangkan penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

3.3 Identifikasi Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun kopi robusta menggunakan pelarut etanol dengan berbagai macam konsentrasi, yaitu 25 gr/dl, 50 gr/dl, 75 gr/dl, dan 100 gr/dl.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah zona inhibisi pertumbuhan *L. acidophilus*.

3.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah sterilisasi alat dan bahan penelitian, suspensi *L. acidophilus*, media pertumbuhan *L. acidophilus*, dan suhu inkubasi (37°C), serta lama inkubasi (24 jam).

3.4 Definisi Operasional Penelitian

3.4.1 Kemampuan Inhibisi Ekstrak Daun Kopi Robusta Menggunakan Pelarut Etanol

Kemampuan inhibisi ekstrak daun kopi robusta menggunakan pelarut etanol terhadap pertumbuhan bakteri *L. acidophilus* diketahui dari adanya zona inhibisi di sekeliling lubang sumuran. Zona Inhibisi pertumbuhan *L. acidophilus* merupakan daerah jernih yang tampak di sekeliling lubang sumuran yang berisi ekstrak daun kopi robusta menggunakan pelarut etanol pada media yang telah diinokulasi bakteri dan kemudian diukur menggunakan jangka sorong *digital*. Diameter zona inhibisi diukur dari tepi ke tepi pada sekeliling zona dengan melewati pusat lubang sumuran. Namun apabila tidak didapatkan zona inhibisi, maka dapat dikatakan bahwa diameternya adalah 0,00 mm (Hudzicki, 2016).

3.4.2 Ekstrak Daun Kopi Robusta Menggunakan Pelarut Etanol

Ekstrak daun kopi robusta (*Coffea canephora*) menggunakan pelarut etanol didapatkan melalui simplisia daun kopi robusta yang telah diblender sebanyak 49,93 gram dan direndam dengan etanol 96gr/dl sebanyak 375 ml selama tiga hari, kemudian disaring menggunakan kertas saring, diuapkan pada *rotary* evaporator, selanjutnya dimasukkan oven, dan terakhir dilakukan pengenceran dengan konsentrasi 25 gr/dl, 50 gr/dl, 75 gr/dl, dan 100 gr/dl.

3.4.3 *Lactobacillus acidophilus*

L. acidophilus yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran (FK) Universitas Brawijaya dan diidentifikasi di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi (FKG) Universitas Jember dengan menggunakan metode pewarnaan Gram. Bakteri tersebut merupakan Gram positif yang berbentuk batang panjang berwarna ungu dan memiliki sifat anaerob fakultatif.

3.5 Sampel Penelitian

3.5.1 Kriteria Sampel

Kriteria sampel yang digunakan dalam penelitian ini antara lain:

- a. Daun dari jenis pohon kopi robusta.
- b. Keadaan daun yang masih segar.
- c. Daun dalam keadaan sehat atau tanpa ditemukan adanya lubang maupun bercak.
- d. Daun diperoleh dari tangkai ke-3 dan 4 pohon kopi robusta.
- e. Daun kopi robusta yang dipetik dari Kebun Fakultas Pertanian Universitas Jember.

3.5.2 Kelompok Sampel

Sampel penelitian yang digunakan dalam penelitian ini dibagi menjadi beberapa kelompok antara lain:

- a. Kelompok P1 : ekstrak daun kopi robusta konsentrasi 25 gr/dl
- b. Kelompok P2 : ekstrak daun kopi robusta konsentrasi 50 gr/dl
- c. Kelompok P3 : ekstrak daun kopi robusta konsentrasi 75 gr/dl
- d. Kelompok P4 : ekstrak daun kopi robusta konsentrasi 100 gr/dl
- e. Kelompok K(-) : kontrol negatif (akuades steril).

3.5.3 Besar Sampel

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini dihitung menggunakan rumus Steel dan Torrie (1995) (Lampiran F). Berdasarkan penghitungan dari rumus tersebut didapatkan hasil bahwa sampel yang digunakan sejumlah 8 buah *plate*, dengan setiap *plate* terdiri dari 4 perlakuan dan 1 kontrol negatif.

3.6 Alat dan Bahan

3.6.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: *petridish* tidak bersekat, kawat ose, gigaskrin, *beaker glass* (Pyrex 100 ml), tabung reaksi (Pyrex, IWAKI TE-32, Indonesia) sebanyak 5 buah, rak tabung reaksi, *laminair flow cabinet* (Super clean dench, HF-100, Korea), desikator (Kartell, Italia), spektrofotometer (Milton Roy Spectronic 20+, 333182, USA), *thermolyne* (Labinco, Belanda), *object glass* (Citoplus, China), neraca, kompor, *tissue*, panci listrik (*Stainless steel termostate electronic Q2*, 8022, Indonesia), kertas label, lap bersih, kapas, alat tulis, *syringe* ukuran 3 ml (OneMed, Indonesia) sebanyak 3 buah, *yellow tip* 20 µl sebanyak 5 buah, mikropipet (Ependorf, Indonesia), mikroskop cahaya (Olympus, CX21LEDFS1, Filipina), optilab (Optilab Advance, Indonesia), jangka sorong *digital* (Inoki, Jepang), inkubator (WTC binder, 1.70530990031.OC, Jerman), laptop, *sterile borer* berdiameter 5 mm, *object glass* (Citoplus, China), *deck glass*, rak pewarnaan, stoples kaca, corong kaca, kertas saring ukuran 40, blender (Nagoya, Indonesia), *autoclave* (Mettler, Jerman), bunsen, dan korek api.

3.6.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: kultur murni *L. acidophilus* (Laboratorium Mikrobiologi FKG Universitas Jember), daun segar dari tangkai ke-3 dan 4 setiap ranting pohon kopi robusta (Kebun Fakultas Pertanian Universitas Jember), akuades steril, alkohol 70gr/dl, etanol 96gr/dl, gas elpiji, larutan pewarnaan

Gram, spiritus, MRS-A (de Man, Rogosa and Sharpe-Agar) (Merck, Jerman), dan MRS-B (de Man, Rogosa and Sharpe-Broth) (Merck, Jerman).

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Tahap Persiapan

a. Identifikasi Bakteri

Proses identifikasi bakteri dilakukan dengan metode pewarnaan Gram. Prosedur dalam pewarnaan Gram awalnya dimulai dengan cara membuat sediaan pada *object glass*, keringkan, kemudian difiksasi di atas api bunsen. Kemudian memberi zat warna utama yaitu ammonium oksalat kristal violet selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir. Setelah cukup kering, diberikan cairan mordant (lugol) selama 1 menit, dan dicuci dengan air mengalir. Selanjutnya ditetaskan larutan alkohol etil dan aseton secara perlahan selama 10-15 detik, sehingga larutan yang mengalir yang tadinya berwarna menjadi tidak berwarna. Cairan setelahnya adalah pemberian *safranin* (II) selama 1 menit, dan dicuci dengan air mengalir, kemudian dikeringkan dalam suhu ruang. Setelah proses pewarnaan selesai, diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x yang sebelumnya telah diberikan minyak imersi, dan ditutup menggunakan *deck glass*, serta mengambil foto sediaan di bawah preparat menggunakan *optilab* (Arrachman, 2016).

b. Sterilisasi Alat

Semua alat yang terbuat dari kaca misalnya tabung reaksi disterilkan dengan *dry heat oven* dengan suhu 171°C selama 60 menit, sedangkan alat yang terbuat dari plastik dicuci bersih terlebih dahulu dan dikeringkan, kemudian diulas dengan alkohol 70gr/dl (Murray *et al*, 2002).

c. Persiapan Ekstrak Daun Kopi Robusta Menggunakan Pelarut Etanol

Daun segar yang didapatkan dari tangkai ke-3 dan 4 setiap ranting pohon kopi robusta dicuci bersih dengan air mengalir dan ditiriskan. Kemudian daun tersebut dipotong kecil-kecil hingga ukuran kurang lebih 2 cm, lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan pada suhu kamar selama satu minggu tanpa terkena sinar matahari hingga kering. Selanjutnya daun yang telah kering dan berwarna coklat dijadikan bubuk halus dengan menggunakan blender kemudian ditimbang, dan didapatkan serbuk simplisia sebanyak 49,93 gram dan dimaserasi dengan etanol 96gr/dl sebanyak 375 ml selama tiga hari dalam stoples yang tertutup rapat. Setelah dimaserasi selama tiga hari, kemudian disaring menggunakan kertas saring. Maserat diuapkan dengan tujuan membebaskan dari pelarut etanol menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 45°-50°C. Setelah itu dioven kembali untuk menghilangkan kadar airnya pada suhu 40°C selama 12 jam.

Konsentrasi ekstrak daun kopi robusta menggunakan pelarut etanol yang digunakan dalam penelitian ini adalah: 100 gr/dl, 75 gr/dl, 50 gr/dl, dan 25 gr/dl, dan untuk mendapatkan konsentrasi tersebut dilakukan dengan cara: 1) 1 gram ekstrak ditambahkan pelarut akuades steril dengan volume 1 ml untuk mendapatkan konsentrasi sebesar 100 gr/dl; 2) untuk mendapatkan konsentrasi ekstrak 75gr/dl: 0,75 gram ekstrak ditambahkan akuades steril sebanyak 1 ml; 3) sedangkan untuk konsentrasi 50gr/dl: 0,5 gram ekstrak dicampurkan dengan akuades steril sebanyak 1 ml; 4) selanjutnya, untuk konsentrasi 25gr/dl: 0,25 gram ekstrak dicampur dengan akuades steril sebanyak 1 ml (Arief, 2000). Larutan akhir dari masing-masing konsentrasi tersebut diletakkan pada tabung reaksi dengan menggunakan *syringe* yang berukuran 3 ml.

d. Pembuatan Media MRS-B

Pembuatan media MRS-B dilakukan dengan cara mencampurkan 5,22 gram MRS-B dan dilarutkan dalam 100 ml akuades steril dan dipanaskan di atas kompor sampai mendidih dan homogen lalu ditutup rapat dengan kapas. Media selanjutnya

disterilkan di *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian dilakukan uji sterilitas, dengan cara memasukkan media pada inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah 24 jam kemudian, media dilihat apakah jernih atau keruh. Apabila keruh maka proses diulang kembali, namun jika jernih menandakan bahwa media steril dan dapat digunakan.

e. Pembuatan Suspensi *L. acidophilus*

Pembuatan suspensi bakteri dengan cara mencampurkan satu ose *L. acidophilus* dengan 2 ml MRS-B di dalam tabung reaksi. Kemudian tabung reaksi dimasukkan ke dalam desikator yang akan diletakkan di inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Pertumbuhan *L. acidophilus* ditandai dengan adanya kekeruhan pada media. Suspensi *L. acidophilus* diambil dari inkubator. Kemudian dicampur hingga homogen menggunakan *thermolyne*. Selanjutnya diukur tingkat kekeruhannya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 580 nm, hingga didapatkan tingkat kekeruhan 0,5 McFarland, dengan konsentrasi yaitu $1,5 \times 10^8$ CFU/ml (Naderi *et al.* 2011:59).

f. Pembuatan Media MRS-A

Proses awal pembuatannya adalah dengan cara menimbang 6,82 gram media MRS-A dan dilarutkan dalam 100 ml akuades steril di tabung *erlenmeyer* dan dipanaskan hingga homogen di atas kompor. Kemudian ditutup rapat menggunakan kapas. Media selanjutnya disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian dilakukan uji sterilitas, dengan cara memasukkan media pada inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah 24 jam kemudian, media dilihat apakah jernih atau keruh. Apabila keruh maka proses diulang kembali, namun jika jernih menandakan bahwa media steril dan dapat digunakan.

g. Inokulasi Suspensi *L. acidophilus* pada Media MRS-A

Media MRS-A yang masih hangat, kemudian dituang ke dalam 8 *petridish* steril masing-masing sebanyak 25 ml dengan ketebalan 5 mm. Kemudian 0,5 ml suspensi *L. acidophilus* diinokulasikan pada media MRS-A dan diratakan dengan gigaskrin agar mampu menyebar, kemudian sediaan ditunggu menjadi padat dan dingin.

h. Pembuatan Lubang Sumuran

Pada bagian bawah *petridish* dibagi menjadi 5 daerah yang sama besar dan diberi kertas label bertuliskan P1, P2, P3, P4, dan K(-). Pembuatan 5 lubang sumuran dilakukan ketika media yang sudah diinokulasi *L. acidophilus* memadat. Pembuatan lubang sumuran ini dilakukan dengan menggunakan *steril borer* yang terbuat dari *stainless steel* dan memiliki diameter 5 mm. Prosedur pembuatan lubang sumuran dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Pembuatan lubang sumuran menggunakan *steril borer*

3.7.2 Tahap Perlakuan

Semua perlakuan dilakukan di dalam *laminair flow* untuk mencegah terjadinya kontaminasi dengan lingkungan luar. Metode yang dilakukan adalah difusi sumuran (*well diffusion method*). Kemudian pada lubang sumuran dengan label P4 dimasukkan hasil ekstrak daun kopi robusta menggunakan pelarut etanol dengan

konsentrasi 100gr/dl sebanyak 20 μ l menggunakan mikropipet yang telah diberi *yellowtip* (Gambar 3.3). Pada lubang sumuran dengan label P3 diberi larutan konsentrasi 75gr/dl, label P2 dengan larutan konsentrasi 50gr/dl, sedangkan label P1 konsentrasi 25gr/dl. Sedangkan pada label K(-) dimasukkan kontrol negatif, yaitu larutan akuades steril. Penggunaan *yellowtip* tersebut selalu diganti setiap pergantian sampel. Setiap perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 8 kali sesuai dengan rumus yang telah dijelaskan. Setelah masing-masing sumuran diisi larutan, selanjutnya 8 *petridish* tersebut dimasukkan ke dalam desikator untuk memperoleh suasana *anaerob* dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C.

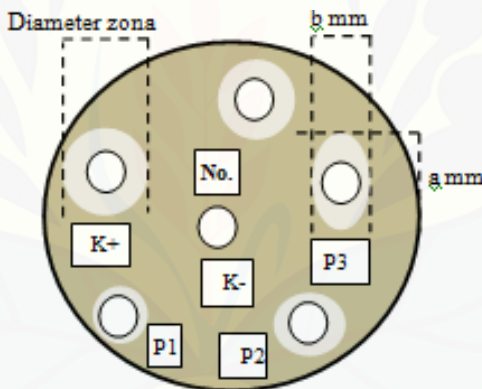


Gambar 3.2 Pemberian setiap kelompok perlakuan pada lubang sumuran menggunakan mikropipet dan *yellow tip*.

3.7.3 Tahap Pengukuran

Setelah diinkubasi selama 24 jam *petridish* dikeluarkan dari desikator yang diletakkan dalam inkubator dan dilakukan pengukuran diameter zona inhibisi. Cara pengukuran diameter zona inhibisi pada awalnya dengan membalik *petridish* agar terlihat jelas zona inhibisinya. Kemudian mengukur diameter zona inhibisi menggunakan jangka sorong *digital* dan dicatat dengan ketentuan sebagai berikut: apabila ada diameter zona inhibisi yang besar dan kecil maka keduanya dijumlahkan kemudian dibagi dua dan dicatat. Misalnya didapatkan zona inhibisi 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. Jadi diameter zona inhibisi $x = \frac{a+b}{2}$ (Gambar 3.4). Apabila terdapat zona inhibisi yang tumpang tindih antar kelompok penelitian, maka diukur dari pusat lubang sumuran ke tepi zona inhibisi sehingga didapatkan jari-jari zona inhibisi, kemudian pengukuran dikalikan dua untuk menentukan diameter zona inhibisi. Sedangkan apabila tidak terdapat zona inhibisi di sekitar lubang sumuran, maka dapat dikatakan bahwa nilai diameter zona inhibisi sebesar 0,00 mm. Pengukuran dilakukan oleh tiga pengamat dan diambil rata-rata (Hardman *et al*, 2001).

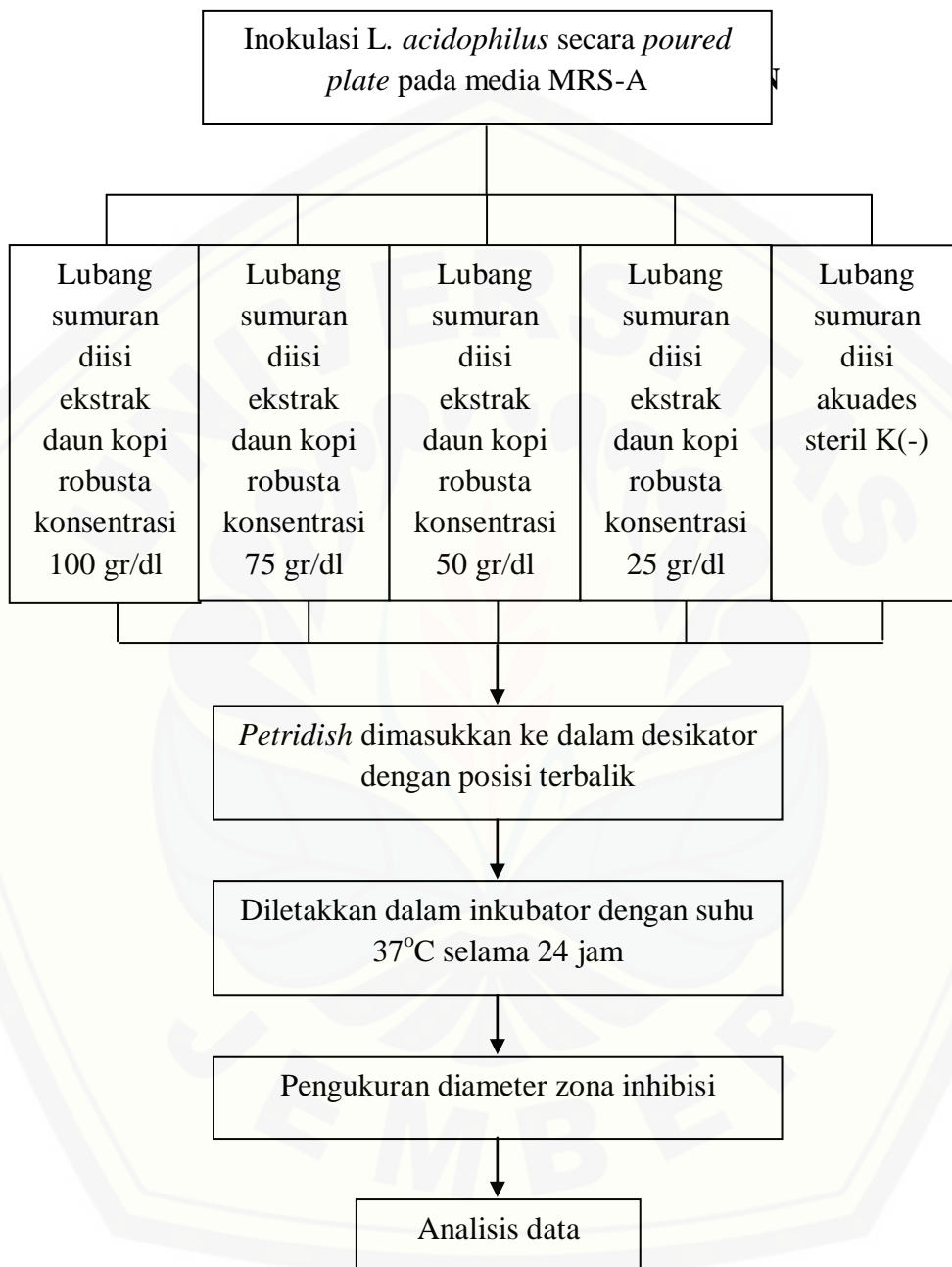


Gambar 3.3 Cara pengukuran diameter zona inhibisi.

3.7.4 Analisis Data

Data hasil penelitian dilakukan uji *Kolmogorov Smirnov* dan uji *Lavene*. Kedua uji menunjukkan bahwa data normal, namun tidak homogen ($p > 0,05$), selanjutnya dilakukan uji parametrik dengan menggunakan *One Way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji *Least Significance Different (LSD)* untuk mengetahui adanya perbedaan antar kelompok. Kemudian dilanjutkan dengan uji statistik non parametrik *Kruskal Wallis* ($p < 0,05$), dan *Mann-Whitney* ($p < 0,05$) untuk menguji perbedaan median dua kelompok penelitian.

3.8 Alur Penelitian



Gambar 3.4 Alur penelitian

A.4.4 Ekstrak Daun Kopi Robusta Konsentrasi 25 gr/ml : Kontrol Negatif

Ranks

	Kelompok Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Diameter Zona Hambat	Konsentrasi 25 gr/ml	8	12.50	100.00
	Kontrol negative	8	4.50	36.00
	Total	16		

Test Statistics^b

	Diameter Zona Hambat
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	36.000
Z	-3.590
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok Perlakuan

A.4.5 Ekstrak Daun Kopi Robusta Konsentrasi 50 gr/ml : 75 gr/ml

Ranks

	Kelompok Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Diameter Zona Hambat	Konsentrasi 50 gr/ml	8	4.50	36.00
	Konsentrasi 75 gr/ml	8	12.50	100.00
	Total	16		

Test Statistics^b

	Diameter Zona Hambat
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	36.000
Z	-3.366
Asymp. Sig. (2-tailed)	.001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Kelompok Perlakuan

A.4.6 Ekstrak Daun Kopi Robusta Konsentrasi 50 gr/ml : 100 gr/ml

Ranks

	Kelompok Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Diameter Zona Hambat	Konsentrasi 50 gr/ml	8	4.50	36.00
	Konsentrasi 100 gr/ml	8	12.50	100.00
	Total	16		

Test Statistics^b

	Diameter Zona Hambat
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	36.000
Z	-3.361
Asymp. Sig. (2-tailed)	.001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Kelompok Perlakuan

A.4.7 Ekstrak Daun Kopi Robusta Konsentrasi 50 gr/ml : Kontrol Negatif

Ranks

	Kelompok Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Diameter Zona Hambat	Konsentrasi 50 gr/ml	8	12.50	100.00
	Kontrol negatif	8	4.50	36.00
	Total	16		

Test Statistics^b

	Diameter Zona Hambat
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	36.000
Z	-3.590
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok Perlakuan

A.4.8 Ekstrak Daun Kopi Robusta Konsentrasi 75 gr/ml : 100 gr/ml

Ranks

	Kelompok Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Diameter Zona Hambat	Konsentrasi 75 gr/ml	8	4.50	36.00
	Konsentrasi 100 gr/ml	8	12.50	100.00
	Total	16		

Test Statistics^b

	Diameter Zona Hambat
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	36.000
Z	-3.366
Asymp. Sig. (2-tailed)	.001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok Perlakuan

A.4.9 Ekstrak Daun Kopi Robusta Konsentrasi 75 gr/ml : Kontrol Negatif

Ranks

	Kelompok Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Diameter Zona Hambat	Konsentrasi 75 gr/ml	8	12.50	100.00
	Kontrol negatif	8	4.50	36.00
	Total	16		

Test Statistics^b

	Diameter Zona Hambat
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	36.000
Z	-3.596
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok Perlakuan

A.4.10 Ekstrak Daun Kopi Robusta Konsentrasi 100 gr/ml : Kontrol Negatif

Ranks

	Kelompok Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Diameter Zona Hambat	Konsentrasi 100 gr/ml	8	12.50	100.00
	Kontrol negatif	8	4.50	36.00
	Total	16		

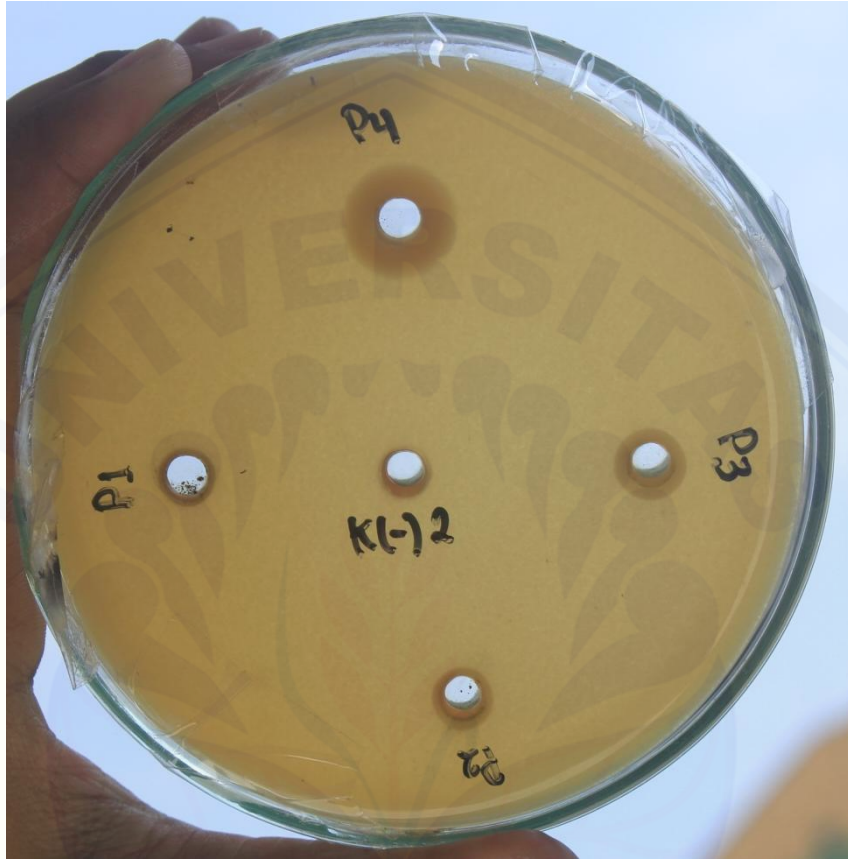
Test Statistics^b

	Diameter Zona Hambat
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	36.000
Z	-3.590
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 ^a

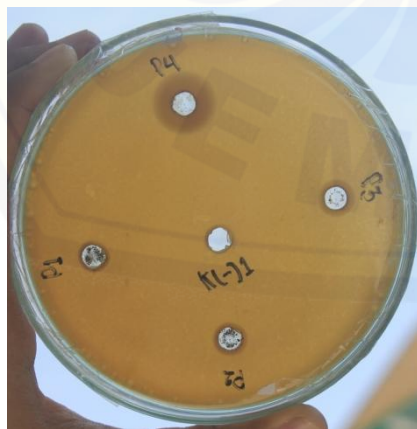
a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok Perlakuan

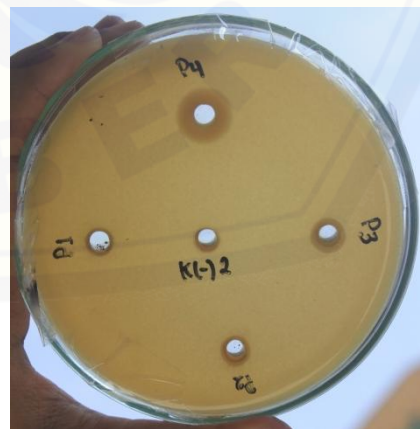
B. Foto Hasil Penelitian



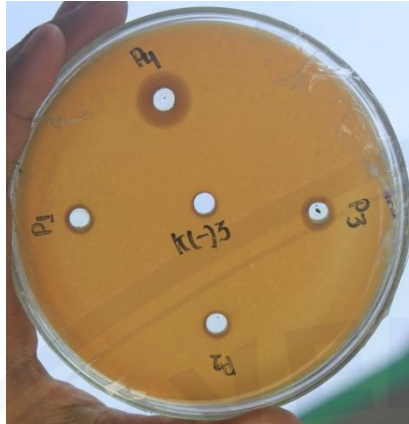
Terdapat zona inhibisi di sekitar lubang sumuran pada pengulangan 2



Pengulangan 1



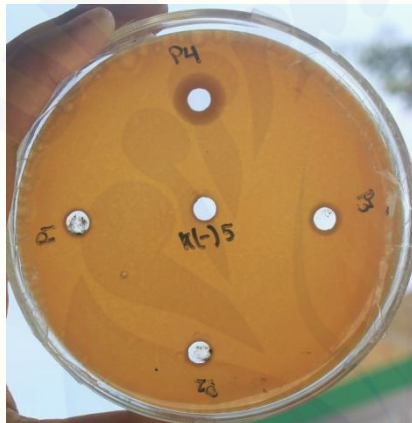
Pengulangan 2



Pengulangan 3



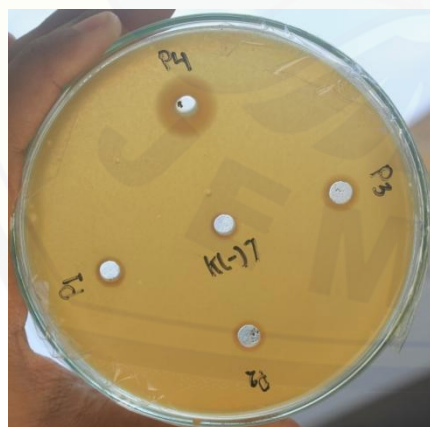
Pengulangan 4



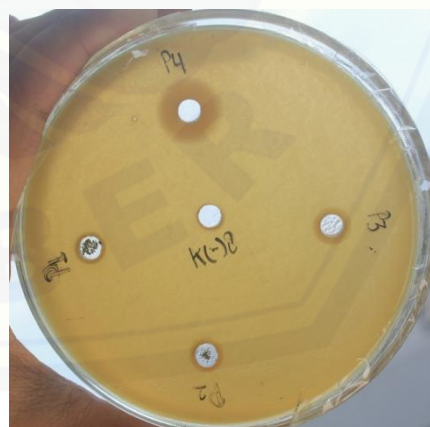
Pengulangan 5



Pengulangan 6



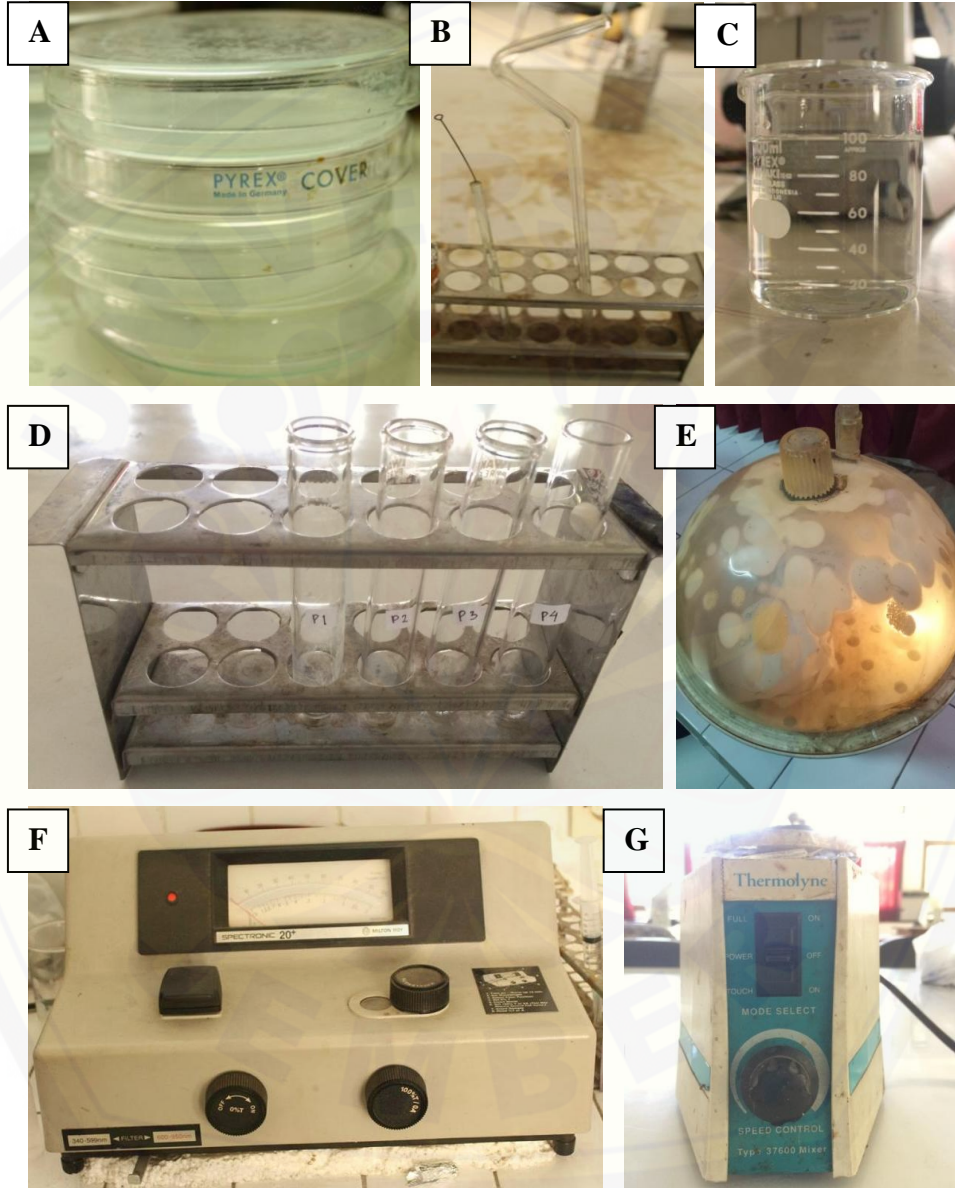
Pengulangan 7



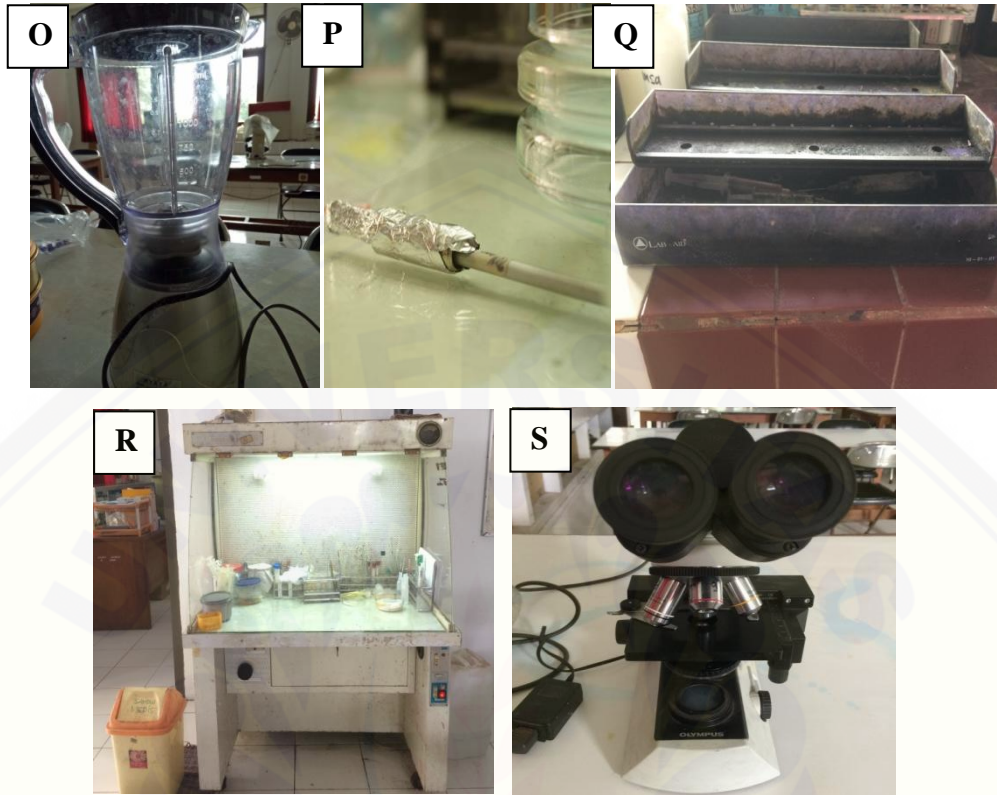
Pengulangan 8

C. Alat dan Bahan Penelitian

C.1 Alat Penelitian



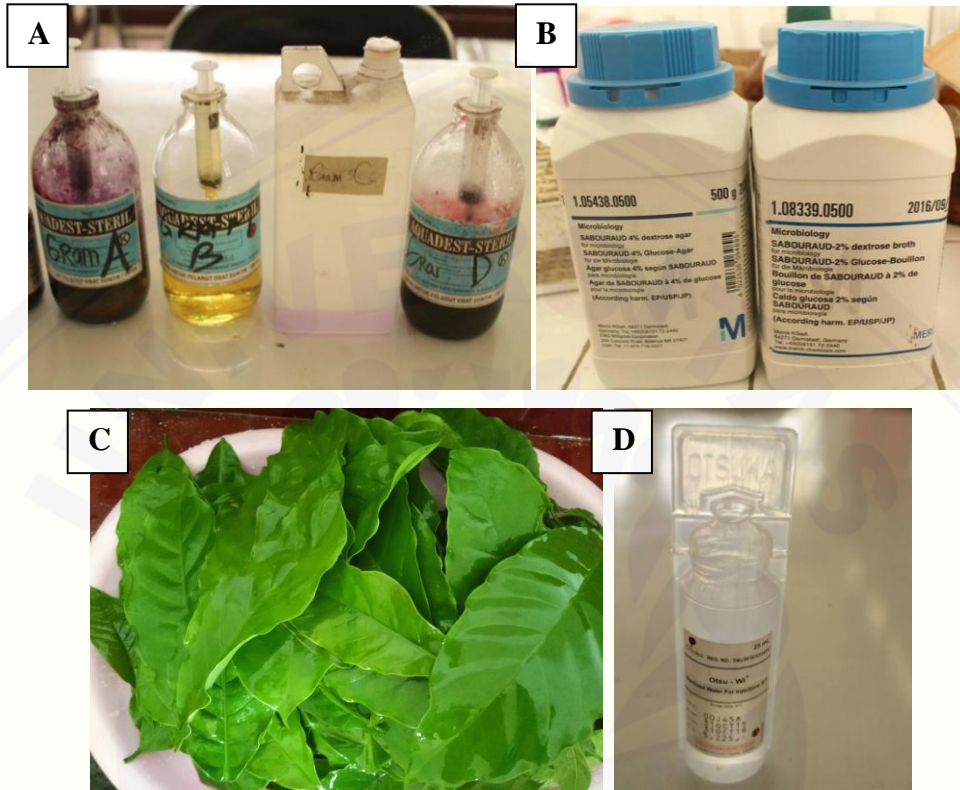




Keterangan:

- A. Petridish tidak bersekat
- B. Kawat ose dan gigaskrin
- C. Beaker glass
- D. Rak dan tabung reaksi
- E. Desikator
- F. Spektrofotometer
- G. Thermolyne
- H. Neraca
- I. Kompor dan panci listrik
- J. Mikropipet
- K. *Yellow tip*
- L. Oven
- M. Inkubator
- N. *Autoclave*
- O. Blender
- P. *Steril borer*
- Q. Rak pengecatan Gram
- R. *Laminair flow*
- S. Mikroskop cahaya

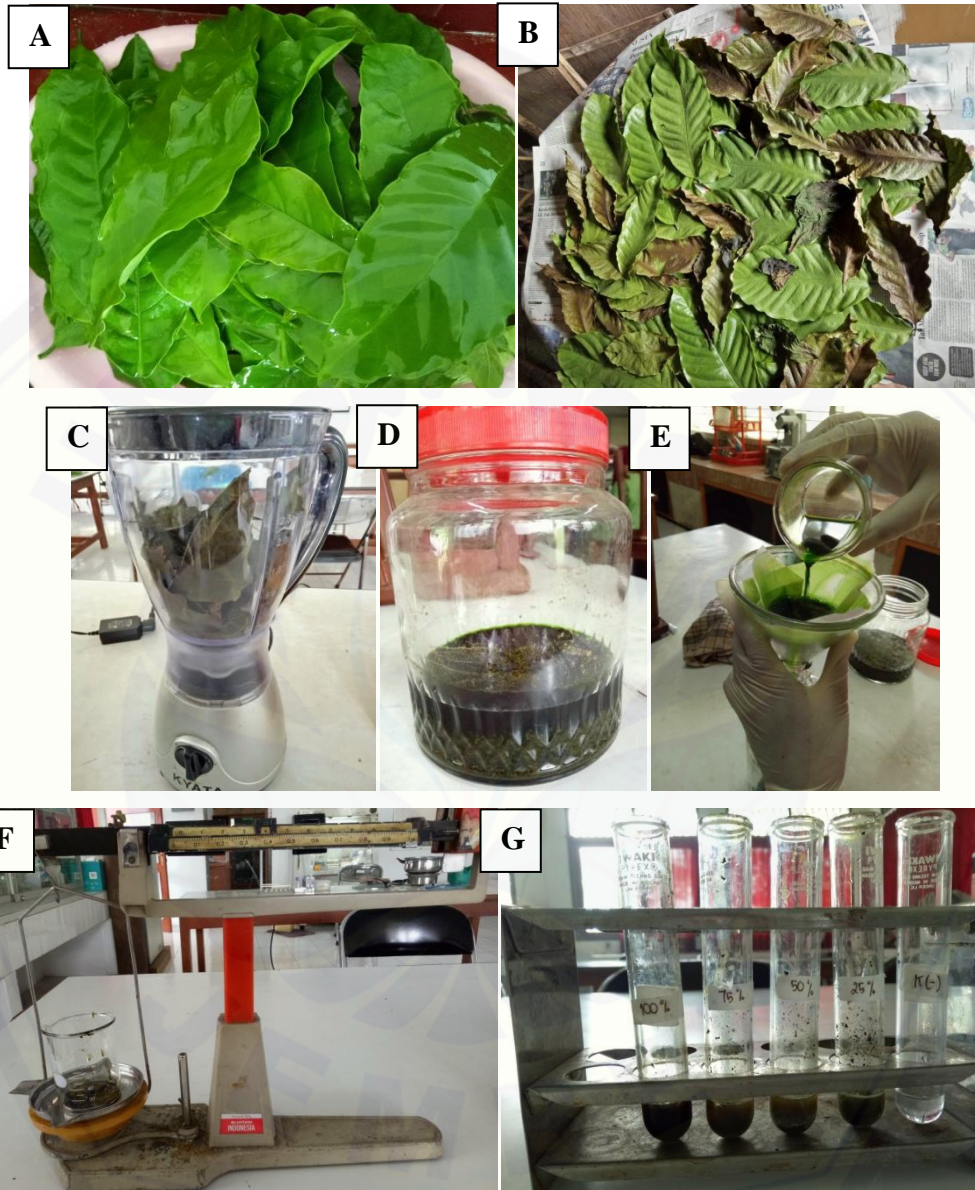
C.2 Bahan Penelitian



Keterangan:

- A. Larutan pewarnaan Gram
- B. MRS-A dan MRS-B
- C. Daun kopi robusta segar
- D. Akuades steril

D. Prosedur Penelitian

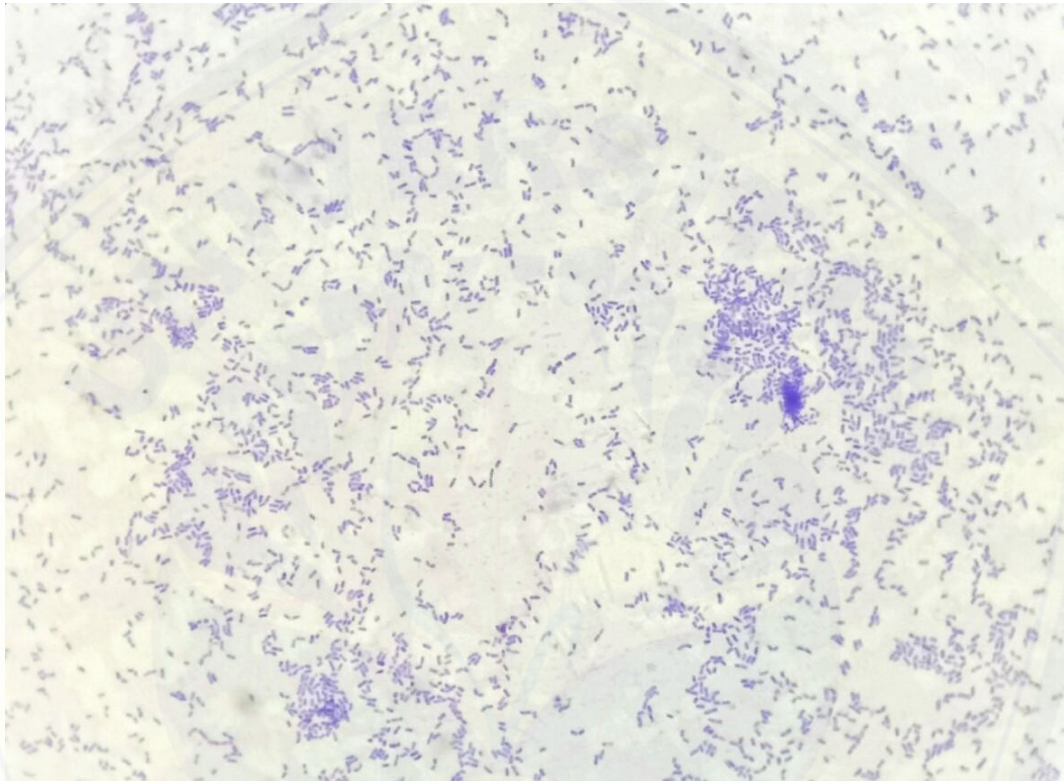


Keterangan:

(A) Daun segar yang telah dicuci bersih menggunakan air mengalir; (B) Daun dikeringkan tanpa terkena sinar matahari selama satu minggu; (C) Daun yang telah kering dihaluskan menggunakan blender hingga membentuk bubuk; (D) Bubuk daun kopi dimaserasi menggunakan etanol 96 gr/ml selama 3 hari; (E) Rendaman disaring menggunakan corong kaca dan kertas saring dan diambil larutannya saja; (F) Ekstrak daun kopi robusta ditimbang sesuai kebutuhan yang telah tercantum; (G) Hasil akhir larutan ekstrak daun kopi robusta.

E. Identifikasi Bakteri *Lactobacillus acidophilus*

Bakteri *L. acidophilus* perbesaran 1000x dengan pengamatan menggunakan mikroskop cahaya:



F. Rumus Penghitungan Jumlah Sampel

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini dihitung menggunakan rumus Steel dan Torrie (1995). Penghitungan berdasarkan rumus tersebut adalah sebagai berikut:

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

Keterangan:

N : Besar sampel minimal

z_{α} : Batas atas nilai konversi pada tabel distribusi normal unuk 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 $\sigma \rho^2 = \delta^2$

Perhitungan jumlah sampel adalah sebagai berikut:

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

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

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

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

Dari hasil penghitungan tersebut, jumlah sampel dalam penelitian ini sebanyak 8 untuk setiap perlakuan.

G. Surat Keterangan Identifikasi Bakteri



LABORATORIUM MIKROBIOLOGI
BAGIAN BIOMEDIK KEDOKTERAN GIGI
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER

SURAT KETERANGAN

No. 0104./MIKRO/S.KET/2016

Sehubungan dengan keperluan identifikasi mikroorganisme, maka kami menerangkan bahwa mahasiswa berikut :

Nama : Ikatanti Ratna Anggraini
NIM : 131610101028
Fakultas : Kedokteran Gigi
Keperluan : Penelitian Skripsi

Telah melakukan uji identifikasi terhadap isolat bakteri *Lactobacillus acidophilus*, dengan menggunakan pengecatan Gram dan diamati secara mikroskopis menunjukkan bakteri *Bacillus* Gram positif dan tidak terkontaminasi.

Jember, 27 September 2016

Mengetahui,

Kepala Bagian Biomedik Kedokteran Gigi

Penanggung Jawab Lab. Mikrobiologi

(drg. Suhartini, M.Biotech)
NIP. 197909262006042002

(drg. Pujiana Endah Lestari, M.Kes)
NIP. 197608092005012002

H. Surat Keterangan Identifikasi Tanaman



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
POLITEKNIK NEGERI JEMBER
JURUSAN PRODUKSI PERTANIAN
Jalan Mastrip Kotak Pos 164 Jember 68101
Telp. (0331) 333532-34; Faks. (0331) 333531; e-mail: politeknik@polije.ac.id

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN

Nomor : 588/PL17.3.1/PP/2016

Berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke Herbarium Jemberiense, Laboratorium Tanaman, Jurusan Produksi Pertanian, Politeknik Negeri Jember oleh:

Nama : Ikatanti Ratna Anggraini
NIM : 131610101028
Jur/Fak/PT : Kedokteran Gigi/ Universitas Jember

maka dapat disampaikan hasilnya bahwa spesimen tersebut dibawah ini (terlampir) adalah:
Domain: Eukaryota; Kingdom: Plantae; Subkingdom: Tracheobionta; Superdivisi: Spermatophyta; Divisi: Magnoliophyta; Kelas: Magnoliopsida; Subkelas: Astridae; Ordo: Rubiales; Famili: Rubiaceae; Genus: Coffea; Spesies: Coffea canephora

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 01 November 2016

Ketua Jurusan

Ir. Cherry Triwidiarto, M.Si
NIP. 19590319 198803 1 005

I. Surat Izin Penelitian Pembuatan Ekstrak



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
Jl. Kalimantan No. 37 Jember ☎(0331) 333536. Fak. 331991

Nomor : 4068UN25.8.TL/2016
Perihal : Ijin Penelitian

07 DEC 2016


Kepada Yth
Kepala Laboratorium Biologi Farmasi
Fakultas Farmasi Universitas Jember
Di
Jember

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan ijin penelitian bagi mahasiswa kami dibawah ini :

- | | | |
|----|-------------------------|--|
| 1 | Nama | : Ikatanti Ratna Anggraini |
| 2 | NIM | : 131610101028 |
| 3 | Semester/Tahun | : 2016/2017 |
| 4 | Fakultas | : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember |
| 5 | Alamat | : Perum Taman Gading JJ-03 |
| 6 | Judul Penelitian | : Kemampuan Inhibisi Ekstrak Etanol Daun Kopi Robusta Terhadap Pertumbuhan Lactobacillus Acidophilus |
| 7 | Lokasi Penelitian | : Lab Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember |
| 8 | Data/alat yang dipinjam | : Alat Ekstrak Etanol Daun Kopi Robusta |
| 9 | Waktu | : Desember 2016 s/d Selesai |
| 10 | Tujuan Penelitian | : Penelitian Skripsi |
| 11 | Dosen Pembimbing | : 1. drg. Pujiana Endah L, M.Kes
2. Dr.drg. H.Herniyati, M.Kes |

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih

an. Dekan
Pembantu Dekan I,


Dr. drg. IDA Susilawati, M.Kes
NIP.1961090319860220014

J. Surat Keterangan Ekstrak Daun Kopi Robusta



**KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS FARMASI**

Jl. Kalimantan 1/2 Kampus Tegal Boto. Telp./ Fax. (0331) 324736 Jember 68121.

SURAT KETERANGAN PEMBUATAN EKSTRAK

Data pemohon :
Nama : Ikatanti Ratna Anggraini
NIM : 131610101028
Fakultas : Kedokteran Gigi Universitas Jember
Bahan : Daun Kopi Robusta (*Coffea canephora*)
Pelarut Pengekstraksi : Etanol 96%
Metode ekstraksi : Maserasi
Prosedur : Serbuk simplisia daun kopi robusta sebanyak 49,93 gram dimaserasi dengan etanol 96% sebanyak 7,5 kali berat serbuk selama 3 hari. Maserat dipekatkan dengan rotary evaporator.
Hasil : Ekstrak etanol daun kopi robusta dengan rendemen 0,09% (b/b)
Tanggal pembuatan : 2 Desember 2016

Jember, 29 Desember 2016

Ketua Bagian Biologi Farmasi

Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt.

NIP. 198107232006042002