



**EFEK SENYAWA POLIFENOL EKSTRAK BIJI KAKAO  
(*Theobroma cacao* L) TERHADAP PERTUMBUHAN  
BAKTERI *Streptococcus viridans***

**SKRIPSI**

Oleh:

**Erwin Indra Kusuma**

**NIM 081610101090**

**BAGIAN BIOMEDIK  
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2012**



**EFEK SENYAWA POLIFENOL EKSTRAK BIJI KAKAO  
(*Theobroma cacao* L) TERHADAP PERTUMBUHAN  
BAKTERI *Streptococcus viridans***

**SKRIPSI**

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

Oleh:

**Erwin Indra Kusuma**

**NIM 081610101090**

**BAGIAN BIOMEDIK  
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2012**

## **PERSEMBAHAN**

Dengan penuh syukur, karya ilmiah ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT dan Nabi Muhammad SAW, semoga karya ilmiah ini menjadi suatu ibadah
2. Mama Yuli Astutik dan Papa Kushandoyo, yang telah memberikan doa, dukungan, semangat, dan kasih sayang
3. Guru-guru dan dosen-dosen yang telah mendidik dan membimbing dengan tulus ikhlas
4. Almamaterku Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

## MOTTO

“Demi masa. Sesungguhnya manusia itu benar-benar dalam kerugian, kecuali orang-orang yang beriman dan mengerjakan amal shaleh dan nasihat-menasihati supaya menaati kebenaran dan nasihat menasihati supaya menetapi kesabaran”  
(terjemahan Surat Al Ashr (103) : 1-3). \*)

---

\*) Departemen Agama Republik Indonesia. 1998. *Al Qur'an dan Terjemahannya*. Semarang: PT Kamudasmoro Grafindo

## PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Erwin Indra Kusuma

NIM : 081610101090

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Efek Senyawa Polifenol Ekstrak Biji Kakao (*Theobroma cacao* L) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus viridans*” adalah benar-benar hasil karya 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 adanya tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 3 Februari 2012

Yang menyatakan,

Erwin Indra Kusuma

NIM 081610101090

**SKRIPSI**

**EFEK SENYAWA POLIFENOL EKSTRAK BIJI KAKAO**  
**(*Theobroma cacao* L) TERHADAP PERTUMBUHAN**  
**BAKTERI *Streptococcus viridans***

Oleh:

Erwin Indra Kusuma

NIM 081610101090

Pembimbing

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

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

## PENGESAHAN

Karya ilmiah berjudul “Efek Senyawa Polifenol Ekstrak Biji Kakao (*Theobroma cacao* L) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus viridans*” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Jumat, 3 Februari 2012

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua,

drg. Depi Praharani, M.Kes

NIP 196801221997022001

Anggota I

drg. Tantin Ermawati, M.Kes

NIP 198003222008122003

Anggota II

drg. Dwi Warna Aju F., M.kes

NIP 197012191999032001

Mengesahkan

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi

Universitas Jember,

drg. Hj. Herniyati, M.Kes

NIP 195909061985032001

## RINGKASAN

**Efek Senyawa Polifenol Ekstrak Biji Kakao (*Theobroma cacao* L) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus viridans*; Erwin Indra Kusuma, 081610101090; 2012: 40 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.**

*Streptococcus viridans* merupakan kelompok bakteri yang menyebabkan infeksi saluran akar dan jaringan periapikal sehingga untuk mengendalikan dan menekan aktivitasnya, diperlukan bahan yang bersifat antibakteri. Dewasa ini sedang digalakkan penggunaan bahan-bahan alami sebagai bahan alternatif karena bahan yang tersedia di pasaran kebanyakan berasal dari bahan sintesis, mahal, dan sering menimbulkan efek samping. Indonesia merupakan salah satu produsen kakao terbesar di dunia hingga saat ini. Jenis kakao yang mendominasi seluruh perkebunan kakao di Indonesia adalah jenis lindak (*Theobroma cacao* L). Tanaman kakao mengandung manfaat di bidang kesehatan, salah satunya karena kandungan polifenolnya. Polifenol merupakan senyawa turunan fenol bersifat antimikroba terhadap beberapa bakteri patogen dan bakteri kariogenik. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui efek senyawa polifenol ekstrak biji kakao terhadap pertumbuhan *S. viridans*.

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian *the post test only control group design*. Jumlah sampel pada penelitian ini adalah 30 buah lubang sumuran yang terbagi dalam 3 kelompok, yaitu kelompok ekstrak senyawa polifenol biji kakao, kontrol positif ( $H_2O_2$  3%), dan kontrol negatif (aquades steril). Masing-masing kelompok dilakukan pengulangan sebanyak 10 kali. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah uji difusi sumuran, yaitu pada setiap media lempeng BHI-A yang sudah diinokulasi *S. viridans* dibuat 3 lubang sumuran yang masing-masing diisi senyawa polifenol ekstrak biji kakao,  $H_2O_2$  3%, dan aquades steril sebanyak 5  $\mu$ l. Efek senyawa polifenol ekstrak biji kakao terhadap pertumbuhan *S. viridans* diketahui dari adanya zona hambat yaitu daerah jernih di sekeliling lubang sumuran yang menandakan adanya hambatan pertumbuhan dari



bakteri tersebut. Pengukuran diameter zona hambat dilakukan untuk mengetahui besarnya hambatan.

Analisis data penelitian ini menggunakan uji statistika nonparametrik karena data terdistribusi normal tetapi tidak homogen dan mempunyai varian yang berbeda. Hasil uji Kruskal Wallis menunjukkan masing-masing kelompok memiliki perbedaan diameter zona hambat yang signifikan ( $p < 0,05$ ) dan hasil uji Mann Whitney juga menunjukkan bahwa antara kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif dan kelompok senyawa polifenol ekstrak biji kakao mempunyai diameter zona hambat yang berbeda secara signifikan ( $p < 0,05$ ).

Kesimpulan yang dapat diambil dari hasil penelitian ini yaitu bahwa senyawa polifenol dari ekstrak biji kakao mempunyai efek menghambat terhadap pertumbuhan *S. viridans*.

## PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT karena atas berkah, rahmat, dan hidayah-Nya skripsi yang berjudul “Efek Senyawa Polifenol Ekstrak Biji Kakao (*Theobroma cacao* L) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus viridans*” dapat terselesaikan. Karya ilmiah ini disusun untuk melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyusunan karya ilmiah ini dapat terselesaikan atas bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan 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 membimbing dan memberikan petunjuk dalam penulisan skripsi ini.
3. drg. Dwi Warna Aju F., M.Kes selaku Dosen Pembimbing Anggota II, yang telah bersedia menguji skripsi ini.
4. drg. Yani Corvianindya, M.KG selaku dosen wali yang telah membimbing saya selama kuliah.
5. Pak Pinardi yang telah membantu disetiap tahap penelitian ini, sehingga penelitian ini dapat selesai dengan lancar.
6. Dr. Misnawi yang telah membantu dan bersedia membukakan pintu untuk bekerjasama dalam menyelesaikan penelitian ini.
7. Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia yang telah memberikan bahan dalam kelancaran penelitian ini.
8. Mama, terima kasih telah sabar mendidiku menjadi seorang anak yang mandiri, setia menemaniku disaat aku mengeluh, dan selalu mendoakanku untuk menjadi

yang terbaik. Semua jasamu tidak akan pernah bisa tergantikan oleh apapun di dalam hidupku.

9. Papa, terima kasih atas segala pengorbanan, dorongan semangat, nasehat, dan doa restunya dan terus membimbingku menjadi seorang dokter gigi.
10. Eyang uti dan Eyang kakung, yang telah terus menyemangatiku untuk selalu berprestasi di bidang akademik.
11. Kakakku Handy Kurniawan, adikku Arfian Arianto dan Yuanita Puspitasari yang telah membuatku mengerti arti seorang kakak ataupun adik bagi kalian, membuatku lebih kuat disaat lemah, dan membuatku lebih dewasa.
12. Natasha G.K. yang telah setia menyemangati disaat sedih dan membantu disetiap kesempatan, terimakasih banyak atas dukungannya selama ini.
13. Tim skripsi Mikrobiologi Mega, Trimey, Dian, Arum, dan Gita terima kasih atas motivasi, bantuan dan dukungannya.
14. Teman-teman satu angkatan 2008 Fakultas Kedokteran Gigi, terima kasih atas kerjasamanya dan dukungannya, kebersamaan bersama kalian membuatku dapat melewati masa-masa sulit saat kuliah.
15. Semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu-persatu, terimakasih banyak sehingga membuat saya dapat menyelesaikan karya ilmiah ini.

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

Jember, Januari 2012

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN MOTO</b> .....	iii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iv
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vi
<b>RINGKASAN</b> .....	vii
<b>PRAKATA</b> .....	ix
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xi
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xiv
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xv
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xvi
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	2
<b>1.3 Tujuan Penelitian</b> .....	2
<b>1.4 Manfaat Penelitian</b> .....	2
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	3
<b>2.1 <i>Streptococcus viridans</i></b> .....	3
2.1.1 Habitat .....	3
2.1.2 Klasifikasi .....	3
2.1.3 Kultur dan Karakteristik .....	3
2.1.4 Patogenitas .....	5

<b>2.2 Tinjauan Umum Kakao (<i>Theobroma cacao</i>)</b> .....	5
2.2.1 Klasifikasi Kakao.....	6
2.2.2 Varietas Kakao .....	6
2.2.3 Deskripsi Botani Kakao .....	7
<b>2.3 Biji Kakao</b> .....	10
<b>2.4 Polifenol</b> .....	11
<b>2.5 Zat Antibakteri</b> .....	14
<b>2.6 Hipotesis</b> .....	15
<b>BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN</b> .....	16
<b>3.1 Jenis Penelitian</b> .....	17
<b>3.2 Tempat dan Waktu Penelitian</b> .....	17
3.2.1 Tempat Penelitian .....	17
3.2.2 Waktu Penelitian.....	17
<b>3.3 Identifikasi Penelitian</b> .....	17
3.3.1 Variabel Penelitian.....	17
3.3.2 Definisi Operasional .....	17
<b>3.4 Sampel Penelitian</b> .....	17
3.4.1 Jumlah Sampel Penelitian.....	17
3.4.2 Pengelompokan Sampel Penelitian.....	17
<b>3.5 Alat dan Bahan Penelitian</b> .....	17
3.5.1 Alat Penelitian.....	17
3.5.2 Bahan Penelitian .....	18
<b>3.6 Prosedur Penelitian</b> .....	18
3.6.1 Tahap Persiapan.....	18
3.6.2 Metode Uji Difusi Sumuran.....	21
3.6.3 Tahap Pengukuran .....	22
3.6.4 Alur Penelitian .....	23
<b>3.7 Analisis Data</b> .....	24

<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>25</b>
<b>4.1 Hasil .....</b>	<b>25</b>
<b>4.2 Pembahasan .....</b>	<b>30</b>
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>33</b>
<b>5.1 Kesimpulan.. .....</b>	<b>33</b>
<b>5.2 Saran.....</b>	<b>33</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>34</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>38</b>

## DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1 Rata-rata diameter zona hambat terhadap pertumbuhan <i>Streptococcus viridans</i> .....	26
4.2 Hasil uji Kolmogorov- Smirnov.....	28
4.3 Hasil uji Levene .....	28
4.4 Hasil uji Kruskal Wallis.....	29
4.5 Hasil uji Mann Whitney .....	29

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 <i>Streptococcus viridans</i> dilihat dengan mikroskop cahaya pada pembesaran 1000 kali .....	4
2.2 Tanaman kakao .....	7
2.3 Biji kakao .....	7
2.4 Akar kakao .....	8
2.5 Daun kakao .....	9
2.6 Bunga kakao.....	10
2.7 Buah kakao .....	10
2.8 Struktur kimia katekin .....	12
2.9 Struktur kimia antosianin .....	13
2.10 Struktur kimia proantosianidin .....	13
3.1 Cara pengukuran diameter zona hambat .....	22
4.1 <i>Streptococcus viridans</i> dilihat dengan mikroskop cahaya pada pembesaran 1000 kali .....	25
4.2 Zona hambat terhadap pertumbuhan <i>Streptococcus viridans</i> .....	26
4.3 Histogram diameter zona hambat terhadap pertumbuhan <i>Streptococcus viridans</i> .....	27



## DAFTAR LAMPIRAN

	<b>Halaman</b>
A. Penghitungan jumlah sampel minimal.....	38
B. Kriteria sampel biji kakao .....	39
C. Prosedur pemisahan senyawa polifenol dari ekstrak biji kakao.....	40
D. Data hasil pengukuran diameter zona hambat .....	41
E. Analisis data penelitian .....	42
F. Foto alat dan bahan penelitian .....	48

## **BAB 1. PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Rongga mulut merupakan tempat yang banyak dijumpai berbagai macam spesies bakteri dan hidup sebagai flora normal. Dari sekitar 350 spesies bakteri yang dikenal sebagai flora normal rongga mulut hanya sebagian kecil saja yang dapat diisolasi dari saluran akar yang terinfeksi terutama bakteri anaerob, fakultatif anaerob, dan sedikit sekali bakteri aerob (Grossman, 1995:256). Menurut Schuster sebagian besar penyebab infeksi saluran akar dan jaringan periapikal adalah *Streptococcus viridans* (*S. viridans*) (Wulandari, 2000:16).

*S. viridans* termasuk kelompok bakteri yang paling banyak ditemui dalam saluran akar atau rongga mulut, bahkan selama kehidupan, 4-12 jam setelah lahir (Nolte, 1985: 302). Bakteri ini berkembang biak di dalam saluran akar dikarenakan proses karies gigi yang berkelanjutan yang tidak dilakukan perawatan, sehingga menyebabkan terjadinya infeksi saluran akar dan jaringan periapikal. Selain itu, penyebaran *S. viridans* melalui aliran darah dapat menyebabkan endokarditis pada katup jantung yang abnormal (Brooks dkk., 2007: 238).

Dewasa ini sedang digalakkan penggunaan bahan-bahan alami sebagai bahan alternatif karena bahan yang tersedia di pasaran pada umumnya berasal dari bahan sintetis, mahal, dan sering menimbulkan efek samping (Rahardjo, 1996:818). Hal inilah yang dijadikan dasar pemanfaatan tanaman obat. Salah satu tanaman yang berkhasiat untuk obat adalah kakao (*Theobroma cacao*).

Indonesia merupakan salah satu produsen kakao terbesar di dunia hingga saat ini. Jenis kakao yang mendominasi seluruh perkebunan kakao di Indonesia adalah lindak (*Theobroma cacao* L). Tahun 2009 produksi biji kakao mencapai 849.875 ton per tahun. Pusat Penelitian Kopi dan Kakao (Puslitkoka) yang berada di kota Jember

merupakan pusat penelitian kopi dan kakao, penghasil kopi dan kakao dalam bentuk makanan dan minuman, bahkan juga menjual bibit kakao (Heriyanto, 2010).

Tanaman kakao selain dapat dijadikan bahan makanan dan minuman, juga bermanfaat di bidang kesehatan. Diduga kandungan bijinya yang mengandung polifenol cukup tinggi dan bersifat antimikroba terhadap beberapa bakteri patogen dan bakteri kariogenik (Misnawi dkk., 2003a:104). Berdasarkan latar belakang di atas, maka peneliti ingin meneliti tentang efek senyawa polifenol dari ekstrak biji kakao terutama jenis lindak (*Theobroma cacao* L) terhadap pertumbuhan *S. viridans*.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Masalah yang dapat dirumuskan dari latar belakang yang telah diuraikan yaitu apakah senyawa polifenol ekstrak biji kakao mempunyai efek terhadap pertumbuhan *S. viridans*?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui efek senyawa polifenol ekstrak biji kakao (*Theobroma cacao* L) terhadap pertumbuhan *S. viridans*.

## **1.4 Manfaat Penelitian**

Hasil penelitian ini diharapkan:

1. Dapat memberi informasi mengenai daya antibakteri senyawa polifenol ekstrak biji kakao (*Theobroma cacao* L) terhadap *S. viridans*.
2. Dapat digunakan sebagai dasar penelitian di bidang kesehatan lebih lanjut.

## BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 *Streptococcus viridans*

#### 2.1.1 Habitat

*S. viridans* berasal dari kelompok organisme yang heterogen dari genus *Streptococcus* dan masuk dalam golongan alfa-hemolitik yang merupakan organisme yang paling banyak ditemui pada saluran akar atau rongga mulut (Nolte, 1985: 302). Henrici dan Hartzel menyatakan bahwa terdapat dominasi *S. viridans* (63%) diikuti *Staphylococcus albus* (17%), *Diphtheroid bacilli* (6,5%) dan aerob pembawa spora, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus proteus*, *Streptococcus haemolyticus* dan *Balatidium coli* di dalam pulpa bernanah dan abses periradikuler akut (Grossman, 1995:256).

#### 2.1.2 Klasifikasi

Klasifikasi dari *S. viridans* sebagai berikut:

Kingdom : Eubacteria  
Phylum : Firmicutes  
Class : Bacilli  
Ordo : Lactobacillales  
Family : Streptococaceae  
Genus : *Streptococcus*  
Species : *Streptococcus viridans*

(Brooks dkk., 2007:11)

#### 2.1.3 Kultur dan Karakteristik

Kultur adalah proses memperbanyak organisme dengan menyediakan keadaan lingkungan yang tepat dan menggunakan media buatan yang steril. Media tersebut mengandung zat makanan, pH, suhu, udara, serta kadar garam dan harus

dikendalikan selama proses pertumbuhan. Beberapa media yang cocok untuk membiakkan *S. viridans* adalah *brain heart infusion broth* (BHI-B) dengan agar 0,1%, media *trypticase soy broth* (TSB), *thioglycollate* dan *glucose ascites broth* (Brooks dkk., 2007:15).

Secara makroskopik koloni *S. viridans* berwarna opak, berdiameter 0,5-1,0 mm, permukaan kasar dan hanya 7% yang licin dan bersifat mukoid. Sedangkan secara mikroskopis *S. viridans* terlihat berbentuk *coccus* atau bulat yang secara khas membentuk pasangan atau rantai selama masa pertumbuhannya dengan diameter sel 0,5-0,7  $\mu\text{m}$  (Brooks dkk., 2007:14). Pada pengecatan Gram, *S. viridans* berwarna ungu yang menunjukkan bahwa *S. viridans* merupakan bakteri golongan Gram positif (Gambar 2.1) (Kunkel, 2004:4).



Gambar 2.1 *S. viridans* dilihat dengan mikroskop cahaya pada pembesaran 1000 kali (Sumber : Kunkel, 2004:4)

#### 2.1.4 Patogenitas

Perjalanan karies dimulai dengan adanya perlekatan bakteri pada permukaan gigi oleh zat adhesin dari *S. mutans* yang berinteraksi dengan protein saliva, yang menyebabkan terjadinya demineralisasi enamel gigi (Rosen dkk., 1995: 76). Proses demineralisasi enamel gigi akan merusak enamel bila invasi bakteri berlanjut ke tubuli dentin akan menyebabkan pulpitis hingga nekrosis pulpa, dari kamar pulpa maka infeksi dapat menyebar ke saluran akar dan jaringan periapikal. *S. viridans* merupakan bakteri yang menyebabkan infeksi saluran akar dan jaringan periapikal (Wulandari, 2000:16).

Apabila *S. viridans* menginfeksi seluruh saluran akar dan terus berkembang, maka infeksi dapat menyebar ke jaringan periapikal melalui foramen apikal. Jika respons imun *host* menyebabkan akumulasi dari netrofil maka akan menyebabkan abses periapikal yang merupakan lesi destruktif pada jaringan. Namun jika respons imun *host* lebih didominasi oleh makrofag dan sel limfosit T, maka akan berkembang menjadi granuloma apikal, ditandai dengan reorganisasi jaringan melebihi destruksi jaringan. Perubahan pada status imun *host* ataupun virulensi bakteri dapat menyebabkan reaktivasi dari *silent periapical lesions* (Sonis dkk., 1995: 399-415).

## 2.2 Tinjauan Umum Kakao (*Theobroma cacao*)

Asal tanaman kakao adalah dari daerah hutan tropis hulu sungai Amazon; yang 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).

### 2.2.1 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*  
(Tjitrosoepomo, 2007:269-274)

### 2.2.2 Varietas Kakao

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

#### a. Criollo

Criollo termasuk kakao yang bermutu tinggi atau kakao mulia/odel kakao atau *fine flavour cacao* (Susanto,1994:21). 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/kakao curai/*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).

### 2.2.3 Deskripsi Botani Kakao

Kakao termasuk tanaman kauliflori yang artinya bunga dan buah tumbuh pada batang dan cabang tanaman (Gambar 2.2) (Susanto, 1994:23).



Gambar 2.2 Tanaman kakao (Sumber : Anonim, 2008:2)

#### a. Biji

Dalam setiap buah terdapat sekitar 20-50 butir biji. Biji kakao berbentuk oval pipih dan dibungkus oleh daging buah atau *pulp*. Panjang biji sekitar 2 cm dengan lebar sekitar 1 cm dan berat  $\pm$  1 gram jika dikeringkan (Gambar 2.3) (Susanto, 1994:25).



Gambar 2.3 Biji kakao (Sumber : Arie, tanpa tahun: 3)



## 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. 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 (Gambar 2.4) (Sunanto, 1992:16).



Gambar 2.4 Akar kakao (Sumber : Anonim, 2008:3)

## 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 (*joquette*). Tinggi batang sampai terbentuk *joquette* sangat bervariasi, tetapi pada umumnya sekitar 1-2 meter dari permukaan tanah (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

Kedudukan daun kakao bersifat *dimorphous* karena percabangannya tanaman kakao bersifat *dimorphous*. Daun pertama mempunyai tangkai daun (*petiol*) yang panjang dan simetris, dan *petiol* tersebut pada ujungnya membengkok (Gambar 2.5) Daun pada cabang kipas, *petiolnya* lebih pendek dan kurang simetris (Sunanto, 1992:18).



Gambar 2.5 Daun kakao (Sumber : Anonim, 2008:6)

#### e. Bunga

Tanaman kakao berbunga sepanjang tahun dan tumbuh secara berkelompok pada bantalan bunga yang menempel pada batang tua, cabang-cabang dan ranting-ranting (Gambar 2.6). Satu bantalan yang baik dapat mengeluarkan bunga yang jumlahnya cukup banyak (Sunanto, 1992:19).



Gambar 2.6 Bunga kakao (Sumber : Anonim, 2008:7)

#### f. Buah

Warna buah kakao beraneka ragam, namun pada dasarnya hanya ada dua warna yaitu buah muda berwarna hijau putih dan bila masak menjadi berwarna kuning, dan buah muda yang berwarna merah setelah masak menjadi jingga (Gambar 2.7) (Susanto, 1994:33).



Gambar 2.7 Buah kakao (Sumber : Anonim, 2011:5)

### 2.3 Biji Kakao

#### a. Kandungan Gizi

Biji kakao mempunyai kandungan protein 9%. karbohidrat 14%, dan lemak 31%. Protein kakao kaya akan asam amino triptofan, fenilalanin, dan tirosin. 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 (Susanto, 1994:175-176). Selain itu, biji kakao juga mengandung polifenol 14% (Ide, 2008:107).

Selama proses pengolahan, biji kakao akan mengalami perubahan fisik, kimiawi, dan biologis. Pada proses pengolahan biji kakao terdapat 2 cara pengeringan, yakni pengeringan yang didahului dengan proses fermentasi dan pengeringan yang tidak didahului proses fermentasi. Fermentasi merupakan suatu proses produksi dengan mikroba sebagai organisme pemroses (Departemen Perindustrian, 2007:9). Fermentasi bertujuan untuk memperbaiki dan membentuk cita rasa khas kakao serta mengurangi rasa pahit dalam biji, tetapi fermentasi ini menyebabkan kandungan polifenol dalam biji kakao berkurang sampai 90% sehingga tinggal 10% saja (Ide, 2008:107).

#### b. Manfaat

Biji kakao mempunyai potensi sebagai bahan antioksidan alami, yakni mempunyai kemampuan untuk memodulasi sistem imun. Selain itu, biji kakao memiliki kandungan polifenol yang bersifat antimikroba terhadap beberapa bakteri patogen dan bakteri kariogenik (Misnawi dkk., 2003a:104). Menurut Hii dkk. (2009:703) polifenol dalam biji kakao mempunyai efek sebagai anti kariogenik, anti arterogenik, anti ulser, anti trombosis, anti inflamasi, imunomodulator, antimikroba, vasodilatori, efek analgesik.

## 2.4 Polifenol

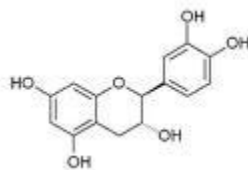
Polifenol yang juga dikenal dengan nama *soluble tanin*, merupakan metabolit sekunder yang terdapat dalam daun, biji dan buah dari tumbuhan tingkat tinggi (Misnawi dkk., 2003a:104). Senyawa ini dapat ditemukan dalam sayuran (brokoli, kol, seledri), buah (apel, delima, melon, ceri, pir, dan stroberi), kacang (walnut, kedelai, kacang tanah), minyak zaitun, dan minuman (seperti teh, kopi, kakao dan

anggur merah). Lee dkk. (2003:47) 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 dkk., 2003b:405).

Tanda khas polifenol yakni memiliki banyak gugus fenol dalam molekulnya. Menurut Wollgast dan Anklam (2000) 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% (Porbowaseso, 2005:7).

Katekin adalah senyawa polifenol alami, merupakan metabolit sekunder dan termasuk dalam penyusun golongan tanin. Katekin biasanya disebut juga asam *catechoat* dengan rumus kimia  $C_{15}H_{14}O_6$  (gambar 2.8) 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 senyawa fenolik yang kompleks (polifenol) yang berkhasiat sebagai antibakteri, hemostasis, astringen dan antioksidan (Lestari dkk., 2009:8).



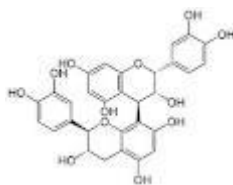
Gambar 2.8 Struktur kimia katekin (Sumber : Anonim, 2011:1)

Antosianin tergolong pigmen yang disebut flavonoid dan pada umumnya larut dalam air (Winarno, 1997:11). Flavonoid merupakan golongan terbesar dari senyawa fenol. Senyawa ini terdapat pada semua bagian tumbuhan termasuk daun, akar, bunga, buah dan biji (Harborne, 1987 dalam Ibtisam, 2008:6). Flavonoid bertindak sebagai penangkal yang baik radikal bebas, menghambat reaksi hidrolisis dan oksidasi enzim, antibakteri, serta antiinflamasi (Gambar 2.9) (Frankel (1995); Pourmorad dkk. (2006); Khotimah (2004) dalam Ibtisam 2008:7).



Gambar 2.9 Struktur kimia antosianin (Sumber : Anonim, 2011:1)

Proantosianidin adalah nama lain dari tanin yang terkondensasi dan 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 (*hydrolyzable tannin*) (Gambar 2.10) (Naczk dkk. (1994) dan Hagerman dkk. (2002) dalam Pambayun, 2007:142).



Gambar 2.10 Struktur kimia proantosianidin (Sumber : Anonim, 2011:2)

## 2.5 Zat Antibakteri

Berdasarkan sifat toksisitas selektifnya, ada zat antibakteri yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri (bakteriostatik) ataupun bersifat membunuh bakteri (bakterisida). Zat antibakteri tertentu aktivitasnya dapat menjadi meningkat dari aktivitas bakteriostatik menjadi aktivitas bakterisid, apabila kadar antimikrobanya ditingkatkan melebihi kadar hambat minimal (Setiabudi dan Gan, 1995:79).

Jawetz dkk. (2001:79) menyatakan bahwa mekanisme kerja zat antibakteri adalah sebagai berikut:

### a. Merusak DNA

Sejumlah zat antibakteri bekerja dengan merusak DNA, seperti radiasi ionisasi, sinar *ultraviolet* (UV), dan DNA *re-active chemicals*. Sinar UV mampu menginduksi *cross-linking* diantara pirimidin yang berbatasan dengan salah satu rantai. Induksi radiasi dan kimia menyebabkan terbunuhnya sel dengan cara mengganggu replika DNA.

### b. Denaturasi protein

Protein terdapat dalam lipatan, bentuk tiga dimensi dinamakan struktur protein tersier, yang cepat diganggu oleh agen fisik atau kimia, menyebabkan protein mengalami denaturasi, sehingga protein tidak dapat berfungsi.

### c. Gangguan membran atau dinding sel

Membran sel bertindak sebagai *selective barrier*, membiarkan larutan lewat dan menolak larutan lain. Membran merupakan tempat enzim yang terlibat dalam biosintesis komponen selaput sel. Substansi yang terkonsentrasi pada permukaan sel mungkin mengubah bentuk fisik dan kimiawi membran, sehingga mengganggu fungsi normalnya dan dapat menyebabkan kematian sel.

### d. Pemindahan kelompok sulfidril bebas

Protein enzim yang mempunyai sisi rantai *terminating* pada kelompok sulfidril. Koenzim seperti koenzim-A dan dihidrolipoat mengandung kelompok sulfidril

bebas. Enzim dan koenzim tersebut tidak berfungsi sebagai kelompok sulfidril tetap bebas dan direduksi agen pengoksida, sehingga mengganggu metabolisme dengan mengikat sulfidril yang bersebelahan pada rantai disulfida. Jadi agen pengoksida dan logam berat akan menyebabkan kerusakan pada sel.

e. Antagonisme kimiawi

Merupakan gangguan oleh agen kimia dengan reaksi normal antara enzim spesifik dan substratnya. Antagonisme bertindak melalui penyatuan dengan beberapa bagian haloenzim, protein apoenzim, *activator mineral*, atau koenzim sehingga mencegah pengikatan substrat normal. Agen antimikroba terdiri dari dua macam yaitu agen fisika yang berupa panas dan radiasi, agen kimia yang berupa bahan-bahan kimia dan agen kemoterapi yang berupa obat-obatan. Agen kimia merupakan agen antimikroba yang paling sering digunakan (Jawetz dkk., 2001:81). Agen kimia yang digunakan berupa bahan-bahan yang mengandung alkohol, aldehyd, fenol, agen pelepas halogen, derivat logam berat, peroksida, senyawa ammonium *quartenary* dan *vapour-phase sterilants* (Jawetz dkk., 2001:83-84)

## 2.6 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah senyawa polifenol dari ekstrak biji kakao (*Theobroma cacao* L) mempunyai efek yaitu menghambat pertumbuhan *S. viridans*.



## **BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN**

### **3.1 Jenis Penelitian**

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris yaitu untuk mengetahui pengaruh pada kelompok perlakuan dengan cara membandingkan kelompok tersebut dengan kelompok kontrol. Adapun rancangan penelitian yang digunakan *the post test only control group design* (Notoatmodjo, 2002:167).

### **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 jenis lindak (*Theobroma cacao* L).

##### **b. Variabel Terikat**

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pertumbuhan *S. viridans*.

##### **c. Variabel Terkendali**

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah suspensi *S. viridans*, media pertumbuhan *S. viridans* (*brain heart infusion* / BHI), suhu inkubasi (37 °C) dan lama inkubasi (24 jam).

#### **3.3.2 Definisi Operasional**

- a. Senyawa polifenol ekstrak biji kakao adalah polifenol konsentrasi 30% yang diperoleh dari ekstrak biji kakao jenis lindak..

- b. Efek terhadap pertumbuhan *S. viridans* dapat diketahui dari adanya zona hambat pada media pertumbuhan, yaitu daerah atau wilayah jernih yang tampak di sekeliling lubang sumuran (Kusmayati dan Agustini, 2007).

### **3.4 Sampel Penelitian**

#### **3.4.1 Jumlah Sampel Penelitian**

Jumlah sampel pada penelitian ini adalah 30 buah lubang sumuran yang terbagi dalam 3 kelompok perlakuan, dimana masing-masing kelompok dilakukan pengulangan sebanyak 10 kali sesuai hasil penghitungan jumlah sampel minimal (lampiran A).

#### **3.4.2 Pengelompokan Sampel Penelitian**

Sampel dibagi 3 kelompok yaitu :

- a. Kelompok A : kontrol negatif (aquades steril)
- b. Kelompok K : kontrol positif ( $H_2O_2$  3%)
- b. Kelompok P : senyawa polifenol ekstrak biji kakao

### **3.5 Alat dan Bahan Penelitian**

#### **3.5.1 Alat Penelitian**

Alat - alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu : blender, pompa vakum, evaporator, *Petridish*, spidol, tabung Erlenmeyer, *beaker glass*, tabung reaksi, neraca (Cent-O-Cram, Ohaus, USA), *ose*, *gigascreen*, *incubator* (Binder, USA), *dry heat oven*, gelas pengukur, pinset, *syringe*, jangka sorong dengan derajat ketelitian 0,5 mm (Medesy, Italia), bunsen, spektrofotometer (Milton Roy), *thermolyne* (Maxi Mix II, Dubuque, Iowa, USA), *laminar flow* tipe HF-100 (Korea), *desicator* (Duran), *thermometer*, spatula, kompor listrik, *autoclave*, sedotan plastik (diameter 5 mm), kaca obyek, mikroskop, dan mikropipet.

### 3.5.2 Bahan Penelitian

Bahan - bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu : bubuk *brain heart infusion agar* (BHI-A), bubuk *brain heart infusion broth* (BHI-B), aquades steril, alkohol 70%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, *physiology zalline* (PZ) steril, galur murni *Streptococcus viridans* (FKG Universitas Airlangga), polifenol 30% dari ekstrak biji kakao (Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Jember), larutan standart Mac Farland 0,5, kapas, larutan ungu Kristal, larutan yodium garam, aseton, larutan safranin, alkohol 95% dan minyak imersi.

## 3.6 Prosedur Penelitian

### 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 121°C sedangkan semua alat yang terbuat dari plastik dicuci bersih dan dikeringkan kemudian diulas alkohol 70% (Fardiaz, 1992).

#### b. Mempersiapkan *laminar flow*

Pertama-tama *laminar flow* dinyalakan dan ditunggu selama kurang lebih 30 menit sebelum dipakai, agar mikroorganisme didalam *laminar flow* mati terlebih dahulu sehingga didapatkan kondisi yang benar-benar steril.

#### c. Identifikasi *S. viridans* secara mikroskopis

*S. viridans* diidentifikasi secara mikroskopis menggunakan preparat apusan yang diberi pengecatan Gram dengan tujuan untuk memastikan bakteri tersebut galur murni (tidak terkontaminasi). Adapun prosedurnya sebagai berikut:

1) memfiksasi apusan dengan pemanasan;

- 2) menetes apusan tersebut dengan larutan ungu kristal, kemudian didiamkan selama 30 detik. Apabila berlebih, zat warna dibuang;
- 3) menambahkan zat larutan yodium garam selama 30 detik, kemudian dibilas dengan air;
- 4) membilas apusan dengan aseton (20 ml dan alkohol 95% (70 ml) selama 10-30 detik hingga zat warna larut kemudian dibilas kembali dengan air;
- 5) menetes apusan dengan larutan safranin, kemudian didiamkan selama 30 detik. Apabila zat warna berlebih, kelebihan zat warna dibuang lalu dibilas dengan air;
- 6) mengeringkan preparat dan di atasnya diberi satu tetes minyak imersi untuk menghindarkan perbedaan indeks bias, kemudian mengamati di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000 kali ( Brooks dkk., 2007:719).

d. Mempersiapkan media pertumbuhan *S. viridans*

1) Mempersiapkan media *brain heart infusion broth* (BHI-B)

Menimbang 3 gram bubuk BHI-B menggunakan neraca dan mengukur aquades steril sebanyak 100 ml dengan gelas ukur. Kedua bahan dimasukkan dalam tabung Erlenmeyer, diaduk dengan spatula dan dipanaskan di atas kompor sampai mendidih. Setelah itu tabung ditutup dengan kapas dan disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Untuk memastikan bahwa media BHI-B dalam keadaan steril, maka media tersebut dimasukkan *incubator* dengan suhu 37°C selama 24 jam (Brooks dkk., 2007: 58-60).

2) Mempersiapkan media *brain heart infusion agar* (BHI-A)

Menimbang 4,7 gram bubuk BHI-A menggunakan neraca dan mengukur aquades steril sebanyak 100 ml dengan gelas ukur. Kedua bahan dimasukkan dalam tabung Erlenmeyer, diaduk dengan spatula dan dipanaskan di atas kompor sampai mendidih. Setelah itu tabung Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.

Untuk memastikan bahwa media dalam keadaan steril maka media tersebut dimasukkan ke *incubator* dengan suhu 37°C selama 24 jam (Brooks dkk., 2007: 58-60).

e. Mempersiapkan suspensi bakteri *S. viridans*

*S. viridans* berasal dari galur murni yang dibiakkan secara *in vitro* di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Cara pembuatan suspensi *S. viridans* yaitu mengambil 2 cc BHI-B yang dimasukkan dalam tabung reaksi dan dicampur dengan 1 ose *S. viridans*. Setelah itu tabung ditutup dan dimasukkan *desicator* kemudian diinkubasi dalam *incubator* dengan suhu 37°C selama 24 jam. *Desicator* merupakan tempat untuk mengondisikan agar lingkungan tersebut terbebas dari kadar oksigen sehingga bakteri anaerob dapat tumbuh dengan baik. Setelah 24 jam suspensi *S. viridans* dikocok dengan *thermolyne* dan diukur tingkat kekeruhannya pada *spectrophotometer* menggunakan larutan standart Mac Farland untuk bakteri 0,5 dengan konsentrasi bakteri  $3 \times 10^6$  / ml. Jumlah bakteri telah memenuhi syarat untuk uji kepekaan yaitu  $10^5 - 10^8$  / ml (Carter dan Cole, 1990: 108-123).

Sebelumnya *spectrophotometer* dikondisikan sebagai berikut:

- 1) *spectrophotometer* dihidupkan dan panjang gelombang diatur menjadi 560 nm;
- 2) tombol absorbansi diputar sampai jarum petunjuk mencapai nilai nol, kemudian tabung reaksi (khusus untuk *spectrophotometer*) dimasukkan, transmitten dikondisikan sampai jarum petunjuk mencapai nilai 100;
- 3) tabung reaksi yang berisi aquades (sebagai blanko) diukur pada *spectrophotometer*, jarum transmitten dilihat dan dikondisikan tetap 100, setelah itu *spectrophotometer* siap untuk menghitung absorbansi suspensi *S. viridans*.

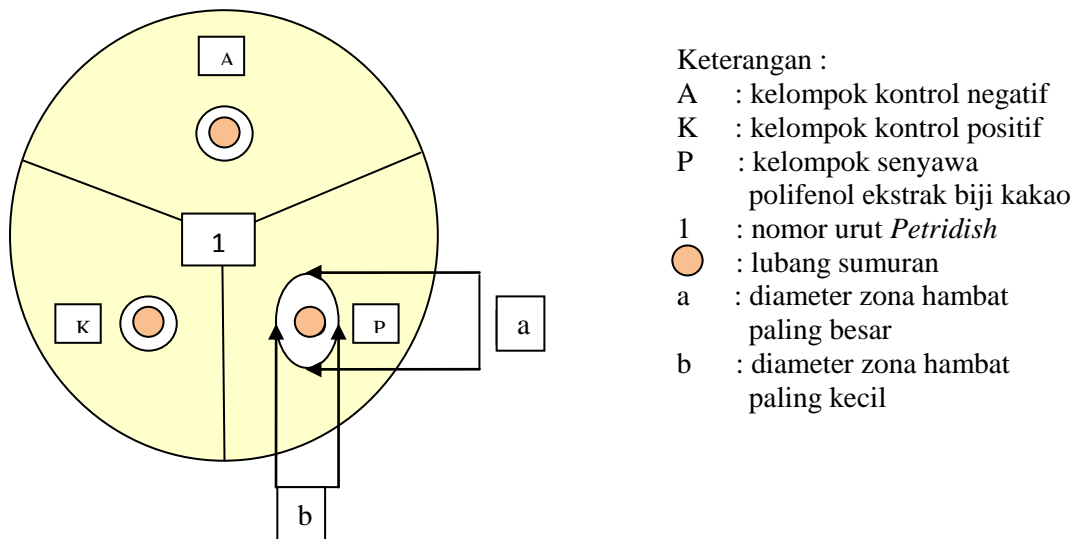
### 3.6.2 Metode Uji Difusi Sumuran

- a. Sepuluh buah *Petridish* pada bagian bawahnya dibagi menjadi 3 daerah sama besar dengan menggunakan spidol dan masing-masing daerah diberi kertas label bertuliskan A (kelompok kontrol negatif), K (kelompok kontrol positif) dan P (kelompok senyawa polifenol ekstrak biji kakao). Kesepuluh *Petridish* dibedakan dengan cara memberikan tanda nomor urut 1 sampai 10 pada bagian tengah.
- b. Media BHI-A yang masih cair dan suhunya sudah turun mencapai 45-50°C (hangat) dituangkan ke seluruh *Petridish* tersebut masing-masing sebanyak 25 ml. Suspensi *S. viridans* sebanyak 0,5 ml yang diambil dari tabung reaksi menggunakan *syringe* diinokulasikan pada setiap media BHI-A dan diratakan dengan gigaskrin. Media yang sudah diinokulasi dibiarkan selama 15 menit agar menjadi padat (media lempeng BHI-A) dan bakteri dapat beradaptasi dengan media.
- c. Membuat 1 lubang sumuran (diameter 5 mm dan kedalaman 4 mm) pada setiap daerah dari media lempeng BHI-A yang telah diinokulasi dengan *S. viridans* menggunakan sedotan plastik.
- d. Memasukkan aquades steril ke dalam lubang sumuran di daerah A, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% di daerah K dan senyawa polifenol ekstrak biji kakao di daerah P, masing-masing sebanyak 5 µl dengan menggunakan mikropipet. Mikropipet tersebut memiliki ujung (*tip*) yang bisa dilepas, sehingga dibutuhkan 3 buah tip karena ada 3 jenis bahan yang dipakai. Semua perlakuan tersebut dilakukan pengulangan sebanyak 10 kali.
- e. Selanjutnya seluruh *Petridish* dimasukkan *desicator* untuk mendapatkan suasana fakultatif anaerob dan diinkubasi dalam *incubator* dengan suhu 37°C selama 24 jam.

### 3.6.3 Tahap Pengukuran

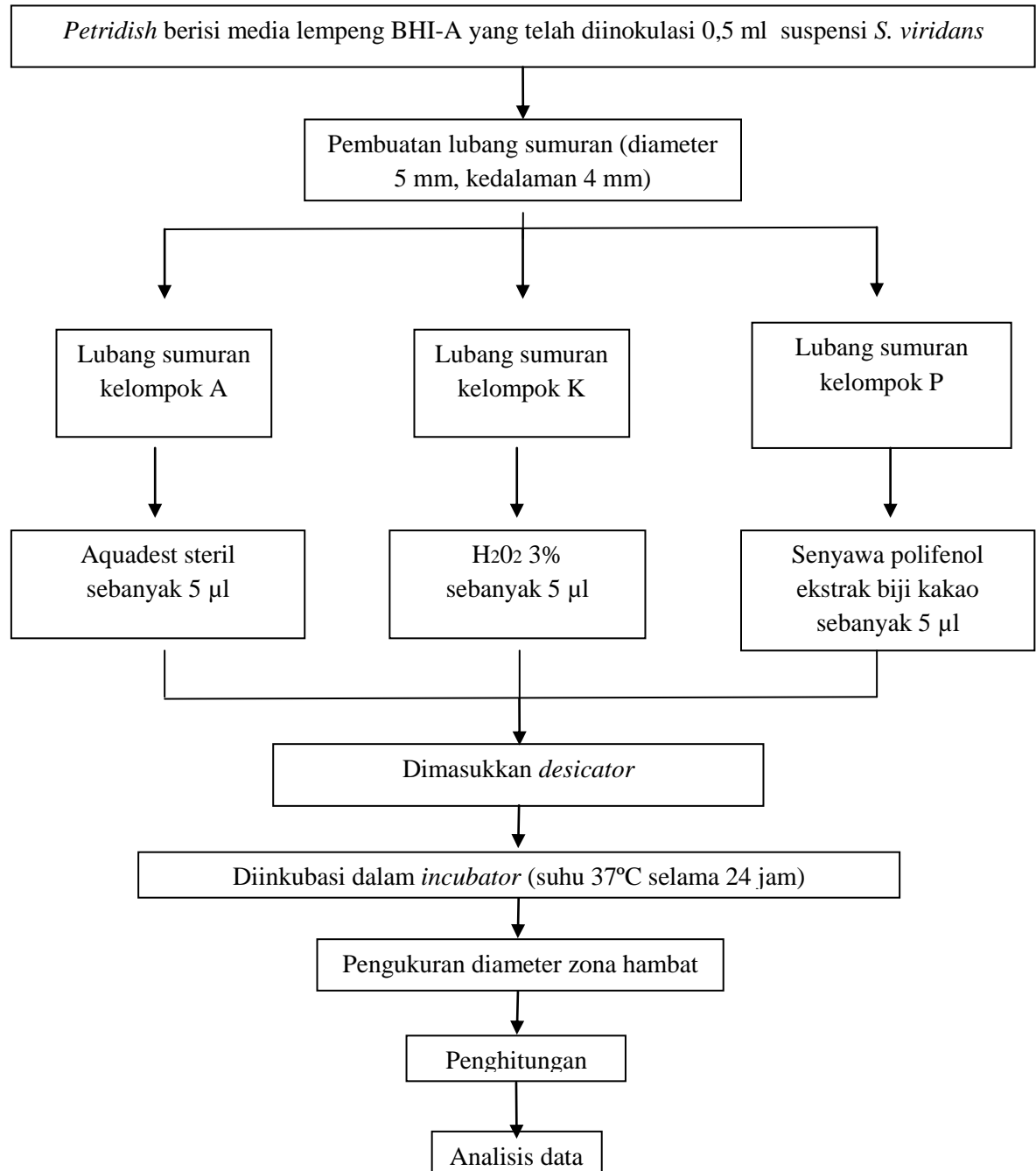
Setelah diinkubasi selama 24 jam dan diperkirakan dalam fase eksponensial yaitu jumlah bakteri sudah mengalami penambahan yang konstan, maka *Petridish* dikeluarkan dari *incubator* dan dilakukan pengukuran diameter zona hambat dengan cara:

- a. *Petridish* dibalik agar terlihat secara jelas zona hambat yang terjadi.
- b. Mengukur diameter zona hambat dengan menggunakan jangka sorong dan dicatat dengan ketentuan sebagai berikut :
  - 1) Apabila ada diameter zona hambat yang besar dan kecil maka keduanya dijumlah kemudian dibagi dua dan dicatat. Misalnya didapatkan zona hambat berbentuk lonjong, maka diukur diameter yang paling besar (misal a mm) dan diameter yang paling kecil (misal b mm) kemudian keduanya dijumlah dan dibagi dua (Gambar 3.1). Jadi diameter zona hambat  $(x) = \frac{a+b}{2}$  (Hardman dkk., 2001:1159).
  - 2) Pengukuran dilakukan sebanyak 3 kali dan diambil rata – rata (Hardman dkk., 2001:1159).



Gambar 3.1 Cara pengukuran diameter zona hambat

## 3.6.4 Alur Penelitian





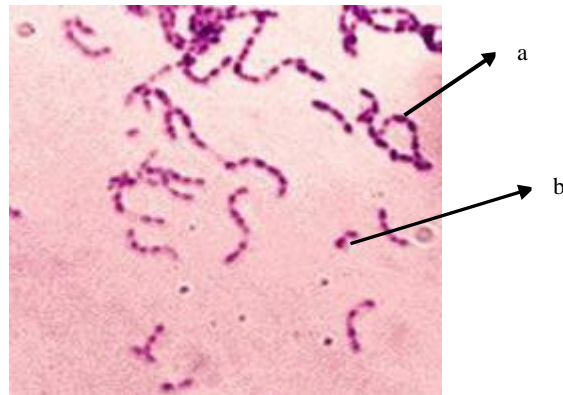
### **3.7 Analisis Data**

Data penelitian dilakukan uji normalitas dan homogenitas. Apabila hasil uji menunjukkan data terdistribusi normal dan homogen maka dilakukan uji statistik parametrik (uji Anova satu arah). Apabila hasil uji menunjukkan data tidak normal atau tidak homogen maka dilakukan uji statistik nonparametrik (uji Kruskal Wallis).

## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Hasil

Hasil identifikasi secara mikroskopis dari galur murni *S. viridans* dapat dilihat pada Gambar 4.1 dibawah ini.



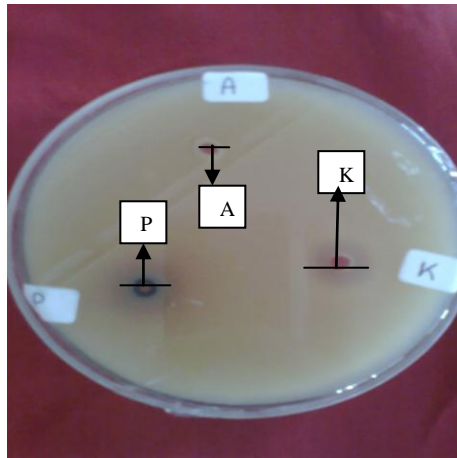
Gambar 4.1 *Streptococcus viridans* dilihat dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000 kali

Keterangan:

- a : susunan sel memanjang seperti rantai
- b : bentuk sel *coccus* / bulat

Pada gambar diatas dapat dilihat bahwa semua sel memiliki bentuk bulat dengan susunan seperti rantai dan berwarna ungu karena *S. viridans* merupakan bakteri golongan Gram positif. Hal ini menunjukkan galur tersebut murni dan tidak terkontaminasi mikroorganisme lain.

Hasil penelitian tentang efek senyawa polifenol ekstrak biji kakao terhadap pertumbuhan *S. viridans* dapat dilihat pada Gambar 4.2



Gambar 4.2 Zona hambat terhadap pertumbuhan *Streptococcus viridans*

Keterangan:

P : zona hambat kelompok senyawa polifenol ekstrak biji kakao

K : zona hambat kelompok kontrol positif

A : zona hambat kelompok kontrol negatif

Data hasil penelitian secara lengkap dapat dilihat pada Lampiran D, sedangkan rata-rata diameter zona hambat terhadap pertumbuhan *S. viridans* setiap kelompok ditampilkan pada Tabel 4.1 dan Gambar 4.3.

Tabel 4.1 Rata-rata diameter zona hambat terhadap pertumbuhan *Streptococcus viridans*.

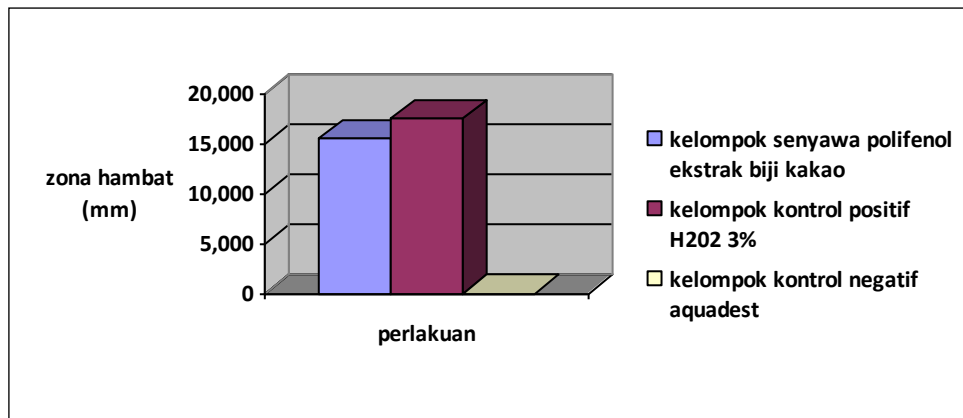
	Kontrol negatif (mm)	Kontrol positif (mm)	Senyawa polifenol ekstrak biji kakao (mm)
$\bar{x}$	5	17,510	15,480
SD	0,0000	0,6624	0,7700
N	10	10	10

Keterangan :

$\bar{x}$  : rata – rata diameter zona hambat

SD : standart deviasi (simpang baku) diameter zona hambat

n : jumlah sampel



Gambar 4.3 Histogram diameter zona hambat terhadap pertumbuhan *Streptococcus viridans*

Pada Tabel 4.1 dan Gambar 4.3 terlihat bahwa kelompok kontrol positif memiliki rata - rata diameter zona hambat yang paling besar yaitu 17,510 mm, kemudian diikuti kelompok senyawa polifenol ekstrak biji kakao dengan rata - rata diameter zona hambat 15,480 mm. Sedangkan pada kelompok kontrol negatif memiliki rata-rata diameter zona hambat 5 mm. Hal ini menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol negatif sebenarnya tidak terdapat adanya zona hambat, karena nilai 5 mm merupakan diameter lubang sumuran.

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

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

1. bila nilai signifikansi lebih besar 0,05 ( $p > 0,05$ ), maka data terdistribusi normal
2. bila nilai signifikansi lebih kecil 0,05 ( $p < 0,05$ ), maka data tidak terdistribusi normal

Hasil uji normalitas diperoleh nilai signifikansi lebih besar dari 0,05 yaitu 0,200 (Tabel 4.2), sehingga dapat diambil kesimpulan bahwa data pada Tabel 4.1 terdistribusi normal.

Tabel 4.2 Hasil uji Kolmogorov- Smirnov

N	30
Kolmogorov-Smirnov	0,200

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 ( $p > 0,05$ ), maka data homogen
2. bila nilai signifikansi lebih kecil 0,05 ( $p < 0,05$ ), maka data tidak homogen

Hasil uji homogenitas diperoleh nilai signifikansinya lebih kecil dari 0,05 yaitu 0,000 (Tabel 4.3) artinya data pada Tabel 4.1 tidak homogen dan mempunyai varian yang berbeda.

Tabel 4.3 Hasil uji Levene

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
14,976	2	27	0,000

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

1. bila nilai signifikansi lebih besar 0,05 ( $p > 0,05$ ), maka tidak ada beda
2. bila nilai signifikansi lebih kecil 0,05 ( $p < 0,05$ ), maka ada beda

Hasil uji Kruskal Wallis diperoleh nilai signifikansi kurang dari 0,05 yaitu 0,000 (Tabel 4.4) artinya masing-masing kelompok memiliki perbedaan diameter zona hambat yang signifikan.

Tabel 4.4 Hasil uji Kruskal Wallis

Chi-Square	Df	Sig.
26,669	2	0,000

Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan diameter zona hambat antar kelompok maka dilakukan uji Mann Whitney.

Hasil uji Mann Whitney pada tabel 4.5 menunjukkan bahwa antara kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif dan kelompok senyawa polifenol ekstrak biji kakao mempunyai perbedaan diameter zona hambat signifikan ( $p < 0,05$ ).

Tabel 4.5 Hasil uji Mann Whitney

Kelompok perlakuan	Kontrol negatif	Kontrol positif	Senyawa polifenol ekstrak biji kakao
Kontrol negatif	-	0,000*	0,000*
Kontrol positif	-	-	0,000*
Senyawa polifenol ekstrak biji kakao	-	-	-

tanda \* menunjukkan nilai yang signifikan

## 4.2 Pembahasan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa polifenol ekstrak biji kakao mampu menghambat pertumbuhan *S. viridans* yang diketahui dari adanya zona hambat, yaitu daerah jernih di sekeliling lubang sumuran. Semakin besar diameter zona hambat, berarti semakin besar kemampuan senyawa tersebut dalam menghambat pertumbuhan bakteri (antibakteri) (Jawetz dkk., 2001:82).

Sifat antibakteri polifenol didapat dari banyaknya gugus fenol dalam molekulnya, diantaranya yaitu katekin dan proantosianidin. Katekin adalah senyawa polifenol alami, merupakan metabolit sekunder dan termasuk dalam penyusun golongan tanin, sedangkan proantosianidin adalah nama lain dari tanin yang terkondensasi (Lestari dkk., 2009:8). Tanin mempunyai daya antibakteri dengan cara mempresipitasikan protein, karena diduga tanin mempunyai efek yang sama dengan senyawa fenolat. Secara umum efek antibakteri tanin adalah bereaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim dan destruksi atau inaktivasi fungsi materi genetik bakteri (Masduki (1996) dalam Grandiosa, 2010:11).

Selain katekin dan proantosianidin, sifat antibakteri polifenol juga didapat dari senyawa antosianin, merupakan golongan pigmen yang disebut flavonoid (Wollgast dan Anklam (2000) dalam Porbowaseso, 2005:7). Flavonoid adalah golongan terbesar dari senyawa fenol dan memiliki mekanisme kerja dalam menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara inaktivasi protein (enzim) pada membran sel sehingga 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 akan berakibat pada hilangnya makromolekul dan ion dari sel, sehingga sel bakteri menjadi kehilangan bentuk dan terjadi lisis (Singh (2005) dalam Rinawati, 2010:9).

Kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri juga dapat dipengaruhi oleh sifat dinding sel bakteri itu sendiri. Pada penelitian ini, bakteri yang diujikan adalah

*S. viridans* yang termasuk golongan Gram positif. Bakteri Gram positif mempunyai struktur dinding sel yang lebih sederhana dibanding struktur bakteri Gram negatif yang lebih kompleks dan berlapis tiga yaitu lapisan luar berupa lipoprotein, lapisan tengah yang berupa peptidoglikan dan lapisan dalam berupa lipopolisakarida. Oleh karena itu senyawa polifenol ekstrak biji kakao lebih mudah masuk ke dalam sel *S. viridans* dan menemukan sasarannya. Meskipun sebenarnya menurut Cowan (1999) dalam Kusmarwati dan Indriati (2008:33), flavonoid dalam senyawa polifenol pada umumnya dapat menghambat pertumbuhan bakteri baik Gram positif maupun Gram negatif.

Kontrol positif pada penelitian ini menggunakan hidrogen peroksida 3% ( $H_2O_2$  3%).  $H_2O_2$  3% adalah salah satu bahan yang sering digunakan dalam irigasi saluran akar karena mudah didapat, dapat menyesuaikan diri dengan lingkungan dimana bahan tersebut diletakkan (biokompatibel), serta dapat mengangkat kotoran dari hasil preparasi saluran akar (Walton dan Torabinejad, 1996:262).  $H_2O_2$  3% apabila berinteraksi dengan darah, pus, serum, air liur dan bahan organik lainnya akan menghasilkan  $H_2O + O_{nascent}$ .  $O_{nascent}$  yang timbul ini bersifat sementara, selanjutnya akan berubah menjadi  $O_2$  (gas oksigen). Gas oksigen tersebut akan menghasilkan gelembung udara kemudian akan membantu pengeluaran kotoran secara efektif. Gas oksigen yang terbentuk juga akan menghancurkan *S. viridans* beserta bahan yang dihasilkan. (Grossman, 1995:201).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa  $H_2O_2$  3% mampu menghambat pertumbuhan *S. viridans* lebih baik dibandingkan senyawa polifenol ekstrak biji kakao. Hal ini disebabkan  $H_2O_2$  merupakan oksidator kuat (bersifat asam) yang dapat merusak membran sel, sehingga mengganggu fungsi normalnya dan dapat menyebabkan kematian sel (Thenard (1818) dalam Peregrin (2007)). Namun, senyawa polifenol ekstrak biji kakao diharapkan bisa digunakan sebagai alternatif bahan irigasi saluran akar karena  $H_2O_2$  memiliki kekurangan, yakni setelah dilakukan irigasi saluran akar harus segera dinetralkan dengan menggunakan aquades karena



apabila dibiarkan gas yang terperangkap di dalam gigi akan menyebabkan rasa sakit dan kerusakan jaringan (Grossman, 1995: 207).

## **BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN**

### **5.1 Kesimpulan**

Kesimpulan hasil penelitian ini bahwa senyawa polifenol dari ekstrak biji kakao (*Theobroma cacao* L) mempunyai efek yaitu menghambat pertumbuhan *S. viridans*.

### **5.2 Saran**

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek ekstrak polifenol biji kakao dengan berbagai konsentrasi terhadap pertumbuhan *S. viridans*.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui biokompatibilitas polifenol terhadap jaringan di rongga mulut agar dapat diaplikasikan secara nyata sebagai medikamen di bidang kedokteran gigi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Arie, A. (tanpa tahun). Pembuatan Coklat dari Biji Coklat Sampai Coklat Siap Makan [serial online]. [www.dalimunthe.com](http://www.dalimunthe.com). [30 Juni 2011].
- Anonim. 2008. Budidaya Tanaman Kakao [serial online]. <http://pertanian-centre.blogspot.com/2008/10/budi-daya-tanaman-kakao.html>). [25 Oktober 2008].
- Anonim. 2011. Dermatology [serial online]. <http://id.hicow.com/british-journal-of-dermatology-1878880.html>
- Brooks, G.F., Butel, J.S., dan Morse, S.A. 2007. *Mikrobiologi Kedokteran Jawetz, Melnick, dan Adelberg*. Edisi 23. Alih bahasa: Huriawati Hartanto. Judul asli: Jawetz, Melnick, and Adelberg's Medical Microbiology. Jakarta: EGC
- Carter, G.R. dan Cole, J.R. 1990. *Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Micology*. 5<sup>th</sup> Edition. California: Academic Press. Inc. San Diego. Hal. 108-123
- Departemen Perindustrian. 2007. *Gambaran Sekilas Industri Kakao*. Jakarta: Departemen Perindustrian
- Departemen Pertanian. 2008. *Standar Nasional Indonesia tentang Biji Kakao*. Jakarta: Badan Standardisasi Nasional
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan*. Bandung: ITB Press
- 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)*. Bandung: Universitas Padjajaran Press.
- Grossman, L. I. 1995. *Ilmu Endodontik dalam Praktek*. Edisi 11. Alih Bahasa: Rafiah Abiyono. Judul Asli: Endodontic Practice. Jakarta: EGC
- Hardman, Limbird, dan Gilman. 2001. *Goodma and Gillman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10<sup>th</sup> Edition. USA: The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Hii, C. L., Lawi, C. L., dan Misnawi . 2009. Polyphenol in cocoa (*Theobroma cacao* L). *Asian Journal of Food and Agro Industry*. Vol. 2.

- Ibtisam. 2008. *Optimasi Pembuatan Ekstrak Daun Dewandaru (Eugenia uniflora L.) Menggunakan Metode Perlokasi dengan Parameter Kadar Total Senyawa Fenolik dan Flavonoid*. Bogor: Institut Pertanian Bogor Press.
- Ide, P. 2008. *Dark Chocolate Healing Mengungkap Kasiat Coklat terhadap Sirkulasi Darah dan Imunitas Tubuh*. Jakarta: PT Elex Media Komputindo.
- Jawetz, Melnick, Joseph L., dan Adelberg CA. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi I. Alih Bahasa: Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Judul asli: Medical Microbiology. Jakarta: Salemba Medika
- Kunkel, D. 2004. *Microscopy of Streptococcus viridans*. (serial on line). <http://www.denniskunkel.com/DK/DK/Bacteria/97700A.html> (17 Januari 2004)
- Kusmarwati dan Indriati. 2008. Daya Hambat Ekstrak Bahan Aktif Biji Picung (*Pangium redule*) terhadap Pertumbuhan Bakteri Penghasil Histamin. *Jurnal Pasca Panen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. Vol. 3.
- Kusmayati dan Agustini, N. W. R. 2007. Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga (*Porphyridium cruentum*). *Biodiversitas*. Vol. 8.
- Lee, K.W., Kim, Y.J., Lee, H.J., dan Lee, C.Y. 2003. Cocoa has More Phenolic Phytochemical and Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *J. Agric. Food. Chem.* Vol. 51.
- Lestari, C., Widjijono, dan 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.
- Misnawi, Jinap, Jamilah, dan Nazamid. 2003a. Effects of Cocoa Liquor Roasting on Polyphenols Content, Their Hydrophobicity and Relation to Astringency. *ASEAN Food Journal*. Vol. 12.
- Misnawi, Jinap, Nafisyah, dan Norhamimah. 2003b. Studies on The Polyphenol Extraction from Cocoa Liquor Roasting. *Food Chemistry*. Vol. 85.
- Nolte. 1985. *Current Advances in Microbiology*. Virginia: Pergamon Press. Vol. 3.

- Notoatmojo, S. 2002. *Metodologi Penelitian*. Edisi Revisi. Jakarta : Penerbit Rineka Pustaka. Hal: 36
- Pambayun, R. 2007. Jenis Katekin dari Ekstrak Gambir Komersial (*Uncaria Gambir Roxb*) yang Memiliki Sifat Antibakteri Paling Kuat. *Jurnal Agribisnis dan Industri Pertanian*, Vol 6.
- Peregrin. 2007. Mengenal Hidrogen Peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [serial online]. <http://www.forumsains.com>. [15 Juni 2007].
- Porbowasoso, T. 2005. *Ekstraksi Polifenol Biji Kakao secara Kimiawi sebagai Antioksidan dan Pewarna Alami*. Jember: Universitas Jember Press
- Rahardjo, M.B. 1996. Kemampuan *Alium sativum* Linn dan *Kaempferia galanga* dalam Menghambat Pertumbuhan *Streptococcus mutans*. *Majalah Kedokteran Gigi, Edisi FORIL V.*
- Rinawati, N. D. 2010. *Daya Antibakteri Tumbuhan Majapahit (Crescentia cujete L.) terhadap Bakteri Vibrio alginolyticus*. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh November.
- Rosen, Samuel, dan Lewis, M.E. 1995. *Essential Dental Microbiology*. USA: Appleton and Lange
- Setiabudi, R. dan Gan, V. H. S. 1995. *Pengantar Antimikroba dalam Farmakologi Terapi*. Edisi 4. Jakarta: Gaya Baru
- Sonis, S.T., Fazio R.C., dan Fang L. 1995. *Principle and Practice of Oral Medicine*. 2<sup>th</sup> Edition. Philadelphia: WB Saunders Company
- Sudarso. 2007. *Membuat Karya Tulis Ilmiah Bidang Kesehatan*. Surabaya : Percetakan Dua Tujuh
- Sunanto, H. 1992. *Cokelat Pengolahan Hasil dan Aspek Ekonominya*. Yogyakarta: Kanisius
- Susanto, FX. 1994. *Tanaman Kakao Budidaya dan Pengolahan Hasil*. Yogyakarta : Kanisius
- Tjitrosoepomo. 2007. *Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta)*. Edisi 9. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press

- Walton, R.E. dan Torabinejad, M. 1996. *Prinsip dan Praktik Ilmu Endodonsia*. Edisi II. Alih Bahasa: Narlan Suwinata. Judul Asli: Endodontics Principles dan Practice. Jakarta: EGC
- Winarno, F.G. 1997. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama
- Wulandari, E. 2000. Khasiat Antibakteri Bahan Irigasi Asam Sitrat 6% dan Klorheksidin Guikonat 0,2% terhadap *Streptococcus viridans* [serial on line]. <http://asic.lib.unair.ac.id/journals/abstrak>. [25 November 2008]

### Lampiran A. Penghitungan jumlah sampel minimal

Jumlah sampel minimal dihitung menggunakan rumus dari Steel dan Torrie:

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

keterangan :

n : besar sampel minimal

$Z_{\alpha}$  : batas atas nilai konversi pada tabel distribusi normal untuk batas atas kemaknaan (1,96)

$Z_{\beta}$  : batas bawah nilai konversi pada tabel distribusi normal untuk batas bawah kemaknaan (0,85)

$\sigma_p^2$  : diasumsikan  $\sigma_p^2 = \delta^2$

$\alpha$  : tingkat signifikansi (0,025)

$\beta$  : 0,20

(Steel dan Torie (1995) dalam Sudarso, 2007:38).

Penghitungan jumlah sampel minimal

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

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

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

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

Berdasarkan penghitungan di atas, diperoleh jumlah sampel minimal adalah 8. Pada penelitian ini digunakan 10 sampel untuk setiap kelompok.

**Lampiran B. Kriteria sampel biji kakao**

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

- a. Jenis kakao lindak
- b. Dipetik dari buah kakao masak (umur 5-6 bulan), berwarna kuning atau jingga.
- c. Proses pengeringan tanpa fermentasi



Biji kakao kering tanpa fermentasi



### **Lampiran C. Prosedur pemisahan senyawa polifenol dari ekstrak biji kakao**

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

Ekstrak biji kakao yang diperoleh dari bubuk biji kakao kering tanpa fermentasi direndam alkohol selama 2 jam dan dipisahkan polifenolnya dengan perbandingan bahan dan pelarut 1 : 6 (100 g : 600 ml). Bahan disaring dengan bantuan pompa vakum agar larutan benar-benar terpisah dari rafinat (endapan bahan). Selanjutnya dilakukan proses evaporasi menggunakan evaporator berputar pada suhu 40-50 °C hingga dihasilkan konsentrat polifenol yang pekat (Departemen Pertanian, 2008:7-13).

**Lampiran D. Data hasil pengukuran diameter zona hambat**

<i>Petridish</i>	Kontrol negatif (mm)				Kontrol Positif (mm)				Senyawa polifenol ekstrak biji kakao (mm)			
	I	II	III	$\bar{x}$	I	II	III	$\bar{x}$	I	II	III	$\bar{x}$
1	5	5	5	5	16,8	17,4	16,9	17,1	16,2	16,3	16,7	16,4
2	5	5	5	5	18,7	18,4	17,5	18,2	14,3	13,9	14,3	14,7
3	5	5	5	5	15,9	17,3	17,2	16,8	15,4	15	15,7	15,5
4	5	5	5	5	17,9	18,4	18,6	18,3	16,5	16,8	16,4	16,3
5	5	5	5	5	18,4	17,3	17,1	17,6	15,1	15,6	15,8	15,9
6	5	5	5	5	18,3	18,5	18,1	18,3	14,8	14,8	14,2	14,6
7	5	5	5	5	15,9	16,7	16,9	16,5	16,4	15,7	15,9	16,0
8	5	5	5	5	17,8	17,3	17,4	17,5	14,9	15,6	14,9	15,1
9	5	5	5	5	17	16,5	17,2	16,9	15,8	16,3	16,2	16,1
10	5	5	5	5	18,4	18	17,3	17,9	15,6	14,5	14,2	14,8

Sumber: data primer

Keterangan :

$\bar{x}$  : rata – rata diameter zona hambat

## Lampiran E. Analisis data penelitian

### Uji normalitas dan homogenitas

#### Tests of Normality<sup>b</sup>

Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk	
	Statistic	df	Sig.	Df	Sig.
zona_hambat Polifenol	.150	10	.200*	10	.669
zona_hambat H2O2 3%	.151	10	.200*	10	.365

a. Lilliefors Significance Correction

\*. This is a lower bound of the true significance.

b. zona\_hambat is constant when perlakuan = aquadest. It has been omitted.

### Uji Kolmogorov-Smirnov

#### Notes

Output Created		20-Oct-2011 08:21:29
Comments		
Input	Active Dataset	DataSet0
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data	30
	File	
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.
Syntax		ONEWAY zona_hambat BY perlakuan /STATISTICS HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS.
Resources	Processor Time	00 00:00:00.015
	Elapsed Time	00 00:00:00.016

### Test of Homogeneity of Variances

zona\_hambat

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
14.976	2	27	.000

### Kruskal-Wallis Test

Ranks

		perlakuan	N	Mean Rank
zona_hambat	polifenol		10	15.55
	H2O2 3%		10	25.45
	aquadest		10	5.50
	Total		30	

### Test Statistics<sup>a,b</sup>

zona_hambat	
Chi-Square	26.669
Df	2
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: perlakuan

### Mann-Whitney Test

Ranks

		perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zona_hambat	polifenol		10	5.55	55.50
	H2O2 3%		10	15.45	154.50
	Total		20		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	zona_hambat
Mann-Whitney U	.500
Wilcoxon W	55.500
Z	-3.745
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 <sup>a</sup>

**Mann-Whitney Test****Ranks**

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zona_hambat	polifenol	10	15.50	155.00
	aquadest	10	5.50	55.00
	Total	20		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	zona_hambat
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	55.000
Z	-4.038
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 <sup>a</sup>

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	zona_hambat
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	55.000
Z	-4.038
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: perlakuan

**Mann-Whitney Test****Ranks**

perlakuan		N	Mean Rank	Sum of Ranks
zona_hambat	H2O2 3%	10	15.50	155.00
	aquadest	10	5.50	55.00
	Total	20		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	zona_hambat
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	55.000
Z	-4.040
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: perlakuan

## Mann-Whitney Test

Ranks

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zona_hambat	polifenol	10	5.55	55.50
	H2O2 3%	10	15.45	154.50
	Total	20		

Test Statistics<sup>b</sup>

	zona_hambat
Mann-Whitney U	.500
Wilcoxon W	55.500
Z	-3.745
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: perlakuan

## Mann-Whitney Test

Ranks

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zona_hambat	polifenol	10	15.50	155.00
	aquadest	10	5.50	55.00
	Total	20		

Test Statistics<sup>b</sup>

	zona_hambat
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	55.000
Z	-4.038
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 <sup>a</sup>

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	zona_hambat
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	55.000
Z	-4.038
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: perlakuan

**Mann-Whitney Test****Ranks**

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zona_hambat	H2O2 3%	10	15.50	155.00
	aquadest	10	5.50	55.00
	Total	20		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	zona_hambat
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	55.000
Z	-4.040
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 <sup>a</sup>



**Test Statistics<sup>b</sup>**

	zona_hambat
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	55.000
Z	-4.040
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: perlakuan

## Lampiran F. Foto alat dan bahan penelitian

### F.1 Foto alat penelitian



Evaporator



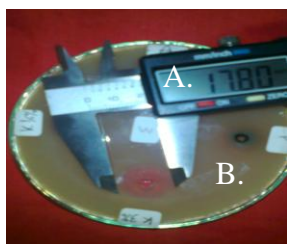
Laminar flow



Autoclave



A. Tabung Erlenmeyer  
B. Pemanas Listrik



A. Mikrometer digital  
B. Petridish



Desicator



*Dry heat oven*



*Incubator*



*Spektrofotometer*

## F.2 Foto bahan penelitian



Senyawa polifenol



Biji Kakao



Aquadest