



**EFEK ANTIBAKTERI POLIFENOL BIJI KAKAO PADA**

*Streptococcus mutans*

**SKRIPSI**

Oleh:

**Kiki Adrianto**

**NIM 081610101113**

**BAGIAN BIOMEDIK  
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2012**



# **EFEK ANTIBAKTERI POLIFENOL BIJI KAKAO PADA**

*Streptococcus mutans*

## **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:

**Kiki Adrianto**

**NIM 081610101113**

**BAGIAN BIOMEDIK  
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2012**

## **PERSEMBAHAN**

Dengan penuh syukur, skripsi ini kupersembahkan untuk:

1. Allah SWT. dan Nabi Muhammad SAW., semoga karya ini menjadi suatu ibadah
2. Ibuku Ernawati Kusuma dan ayahku Winny Adriatmoko, yang telah memberikan doa, dukungan, semangat, dan kasih sayang.
3. Guru-guru dan dosen-dosen yang telah mendidik dan membimbingku
4. Almamaterku Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

## **MOTTO**

“Manfaatkan masa mudamu sebelum datang masa tuamu, manfaatkan masa luangmu sebelum datang masa sibukmu, manfaatkan waktu sehatmu sebelum datang waktu sakitmu, manfaatkan waktu kayamu sebelum datang waktu miskinmu, manfaatkan hidupmu sebelum datang matimu” (Rasulullah SAW).

## **PERNYATAAN**

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Kiki Adrianto

NIM : 081610101113

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis ilmiah yang berjudul “Efek Antibakteri Polifenol Biji Kakao Pada Streptococcus mutans” 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, 2 Februari 2012

Yang menyatakan,

Kiki Adrianto

NIM 081610101113

**SKRIPSI**

**EFEK ANTIBAKTERI POLIFENOL BIJI KAKAO PADA**

*Streptococcus mutans*

Oleh:

Kiki Adrianto

NIM 081610101113

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. drg. Purwanto, M.Kes

Dosen Pembimbing Anggota : drg. M. Nurul Amin, M.Kes

## PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Efek Antibakteri Polifenol Biji Kakao Pada Streptococcus mutans”  
telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Kamis, 2 Februari 2012

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua,

Dr. drg. Purwanto, M.Kes

NIP 195710241986031002

Anggota I

drg. M. Nurul Amin, M.Kes

NIP 197702042002121002

Anggota II

drg. Desi Sandra Sari, MD. Sc

NIP 197512152003122005

Mengesahkan

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi

Universitas Jember,

Drg. Hj. Herniyati, M.Kes

NIP 195909061985032001

## RINGKASAN

**Efek Antibakteri Polifenol Biji Kako Pada *Streptococcus mutans***; Kiki Adrianto, 081610101113; 2012: 44 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Tanaman kakao diketahui memiliki banyak manfaat di bidang kesehatan. Polifenol biji kakao merupakan salah satu bahan bioaktif pada biji kakao yang diduga dapat dimanfaatkan dalam menghambat proses pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. *Streptococcus mutans* merupakan bakteri utama penyebab karies gigi dan penyakit rongga mulut lainnya.

Pada penelitian ini polifenol biji kakao dibagi menjadi empat konsentrasi yang berbeda, yakni konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%. Pembagian konsentrasi ini bertujuan untuk melihat kemampuan polifenol dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.

Analisis statistik *ANOVA* satu arah membuktikan adanya perbedaan yang bermakna ( $p < 0,05$ ) pada variabel-variabel yang dibandingkan. Pada uji lanjutan *Tukey HSD* didapatkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ( $p < 0,05$ ) pada masing-masing variabel yang diuji, kecuali pada variabel polifenol 25% dibandingkan dengan polifenol 50%, polifenol 50% dibandingkan dengan polifenol 75%, polifenol 75% dibandingkan dengan polifenol 100%, dan chkm dibandingkan dengan cresophene.

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa polifenol memiliki sifat antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. Polifenol 100% didapatkan mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S.mutans* lebih efektif dibandingkan dengan konsentrasi lainnya. Polifenol dibandingkan dengan chkm, eugenol, dan cresophene kurang begitu efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S.mutans*.



## PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT karena atas berkah, rahmat, dan hidayah-Nya skripsi yang berjudul *Efek Antibakteri Polifenol Biji Kakao Pada Streptococcus mutans* dapat diselesaikan. Skripsi ini disusun untuk melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi 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. Dr. drg. Purwanto, M.Kes, selaku Dosen Pembimbing Utama dan drg. M. Nurul Amin, M.Kes selaku Dosen Pembimbing Anggota, yang telah membimbing dan memberikan petunjuk dalam penulisan skripsi ini.
3. Drg. Desi Sandra Sari MD. Sc., selaku Dosen Pembimbing Anggota II, yang telah bersedia menguji skripsi ini.
4. drg. Sonny Soebiyantoro, M.Kes, 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. Ibu, terima kasih telah sabar mendidikku menjadi seorang anak yang mandiri, setia menemaniku disaat aku mengeluh, dan selalu mendoakanku untuk menjadi yang terbaik. Semua jasmu tidak akan pernah bisa tergantikan oleh apapun di dalam hidupku.

9. Ayah, terima kasih atas segala pengorbanan, dorongan semangat, nasehat, dan doa restunya dan terus membimbingku menjadi seorang dokter gigi.
10. Eyanguti dan mami, yang telah terus menyemangatiku untuk selalu berprestasi di bidang akademik.
11. Adikku Fanny Ernawan dan Jodie Winanda yang telah membuatku mengerti arti seorang kakak bagi kalian, membuatku lebih kuat disaat lemah, dan membuatku lebih dewasa.
12. Novema Yolanda yang telah setia menemani disaat sedih dan membantu disetiap kesempatan, waktu bersamamu adalah waktu yang terindah di hidupku, terimakasih banyak atas dukunganmu selama ini.
13. Tim skripsi Biodok Kiki, Nizar, Rere, Icha, Ais dan Lila terima kasih atas motivasi, bantuan dan dukungannya.
14. Teman-teman satu angkatan 2008 Fakultas Kedokteran Gigi, terima kasih atas kerjasamanya, 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 skripsi ini.

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

Jember, 2 Februari 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> .....	viii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	x
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xiii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xiv
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xv
<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> .....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
<b>2.1 Kakao</b> .....	4
2.1.1 Klasifikasi .....	4
2.1.2 Jenis Kakao .....	4
2.1.3 Morfologi Kakao.....	4
2.1.4 Biji Kakao .....	5
2.1.5 Ekstraksi Lemak Kakao .....	6
<b>2.2 Polifenol</b> .....	8
2.2.1 Ekstraksi Polifenol Kakao.....	8

<b>2.3 Bahan Perbandingan Sifat Antibakteri.....</b>	<b>9</b>
2.3.1 Eugenol .....	9
2.3.2 Cresophene.....	10
2.3.3 Chkm.....	10
<b>2.4 Antibakteri .....</b>	<b>12</b>
2.4.1 Mekanisme Kerja Antibakteri.....	12
<b>2.5 <i>Streptococcus mutans</i> .....</b>	<b>14</b>
2.5.1 Taksonomi <i>S.mutans</i> .....	14
2.5.2 Morfologi <i>S.mutans</i> .....	17
2.5.3 Habitat <i>S.mutans</i> .....	18
2.5.4 Patogenitas <i>S.mutans</i> .....	19
<b>BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1 Jenis Penelitian.....</b>	<b>22</b>
<b>3.2 Waktu dan Tempat Penelitian.....</b>	<b>22</b>
3.2.1 Waktu Penelitian.....	22
3.2.2 Tempat Penelitian .....	22
<b>3.3 Sampel Penelitian .....</b>	<b>22</b>
<b>3.4 Identifikasi Variabel.....</b>	<b>22</b>
3.4.1 Variabel Bebas .....	22
3.4.2 Variabel Terikat .....	22
3.4.3 Variabel Terkendali .....	23
<b>3.5 Definisi Operasional .....</b>	<b>23</b>
3.5.1 Polifenol Biji Kakao .....	23
3.5.2 <i>Streptococcus mutans</i> .....	23
3.5.3 Efek Antibakteri Polifenol Biji Kakao.....	24
<b>3.6 Alat dan Bahan .....</b>	<b>24</b>
3.6.1 Alat.....	24
3.6.2 Bahan .....	24
<b>3.7 Cara Kerja Penelitian .....</b>	<b>24</b>

3.7.1 Persiapan Polifenol Biji Kakao .....	24
3.7.2 Persiapan Bahan Perbandingan Sifat Antibakteri .....	25
3.7.3 Pembuatan Media Kultur .....	25
3.7.4 Metode Uji Difusi Cakram.....	26
<b>3.8 Metode Analisis Data.....</b>	<b>26</b>
<b>3.9 Alur Penelitian .....</b>	<b>27</b>
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>28</b>
<b>4.1 Hasil Penelitian .....</b>	<b>28</b>
4.1.1 Data Penelitian .....	28
4.1.2 Analisis Data.....	30
<b>4.2 Pembahasan .....</b>	<b>32</b>
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>37</b>
<b>5.1 Kesimpulan.....</b>	<b>37</b>
<b>5.2 Saran.....</b>	<b>37</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>38</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>45</b>

## DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Komposisi kimia biji kakao .....	6
4.1 Rata-rata hasil pengukuran zona hambat .....	29
4.2 Hasil uji lanjutan <i>Tukey HSD</i> .....	32

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Biji kakao .....	7
2.2 Rumus kimia eugenol.....	9
2.3 Struktur kimia Chkm.....	11
2.4 Gambaran mikroskopis koloni <i>S. mutans</i> pada epitel lidah .....	17
2.5 Gambaran mikroskopis koloni <i>S.mutans</i> .....	19
3.1 Bagan alur penelitian.....	27
4.1 Bakteri <i>S.mutans</i> dengan pengecatan gram.....	28
4.2 Hasil uji kertas difusi cakram.....	29
4.3 Histogram rata-rata pengukuran zona hambat .....	30

## DAFTAR LAMPIRAN

	<b>Halaman</b>
A. Perhitungan Besar Sampel Penelitian .....	45
B. Foto Alat Penelitian .....	46
C. Foto Bahan Penelitian .....	48
D. Data Hasil Penelitian Dengan 3 kali pengukuran .....	49
E. Analisis Data Penelitian .....	51



## **BAB 1. PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Tanaman kakao banyak tumbuh dan diproduksi di Indonesia, sehingga sangat potensial untuk dimanfaatkan. Tanaman ini diproduksi hingga 435.000 ton pertahun di Indonesia, sehingga Indonesia merupakan produsen kakao terbesar ketiga setelah Ivory Coast dan Ghana (Ed dan F Man, 2004). Salah satu potensi pada tanaman kakao yang bisa dimanfaatkan ialah pada bidang kesehatan (Misnawi *et al.* 2008).

Biji kakao merupakan salah satu bagian tanaman kakao yang diyakini memiliki banyak manfaat di bidang kesehatan (Misnawi *et al.*, 2008). Tanaman kakao memiliki 20-50 butir biji yang terdapat dalam tiap buahnya. Kandungan yang terdapat pada biji kakao antara lain: lemak 55-60%, karbohidrat 15%, dan polifenol 5-18%. Polifenol biji kakao terdapat dalam bubuk bebas lemak yang pembentukannya telah dimulai sejak awal pembentukan biji (Misnawi *et al.*, 2002a,b).

Polifenol telah diketahui dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan, antiulserik, antimutagenik, antibakteri, menghambat pertumbuhan kanker dan tumor, serta dapat mengurangi penyakit karena oksidasi *low density lipoprotein* (LDL) (Kattenberg, 2000; Osakabe *et al.*, 2000, 1998a,b; Sanbongi *et al.*, 1998; dalam Misnawi *et al.*, 2008). Sifat antibakteri polifenol telah diuji terhadap bakteri gram positif *Bacillus subtilis* dan bakteri gram negatif *Eschericia coli*. Hasil dari penelitian tersebut dapat membuktikan bahwa polifenol dari biji kakao memiliki pengaruh yang signifikan dalam proses penghambatan pertumbuhan dari bakteri *Bacillus subtilis* maupun *Eschericia coli* (Prayoga, 2010).

Polifenol memiliki banyak kandungan bahan aktif di dalamnya yang dapat dimanfaatkan di bidang kesehatan. Beberapa kandungan polifenol biji kakao yang bermanfaat di bidang kesehatan ialah flavonoid dan EGCG. Polifenol memiliki

senyawa *Epigalokatengingalat* (EGCG) yang selain berfungsi sebagai antioksidan juga diduga dapat bermanfaat dalam penghambatan aktivitas biologis bakteri *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) dan *Streptococcus sobrinus* (*S. sobrinus*) yang berperan penting sebagai bakteri penyebab karies (Misnawi *et al.*, 2008).

Penelitian terdahulu tentang polifenol biji kakao telah banyak dilaporkan, tetapi penelitian pemanfaatan polifenol biji kakao sebagai penghambat pertumbuhan bakteri *S. mutans* masih belum pernah dilakukan. Penelusuran di *Patent Database* (USA) mendapatkan 16 paten yang berhubungan dengan polifenol biji kakao. Penelitian-penelitian polifenol kakao yang ada selama ini difokuskan pada kajian sifat-sifat antioksidan, nutrasetikal dan klinikal (Lee *et al.*, 2003; Penny dan Keen, 2002; Pearson *et al.*, 2002; Dreosti, 2000; Steinberg *et al.*, 2002; Baba *et al.*, 2000; Holt *et al.*, 2002; Karim *et al.*, 2000; Ooshima *et al.*, 2000; Kattenberg, 2000; Osakabe *et al.*, 1998a,b, 2000; Sanbongi *et al.*, 1998), Potensi produksi (Misnawi *et al.*, 2003b), metode analisis dan identifikasi (Wollgast dan Anklam, 2001; Adamson *et al.*, 1999; Hammerstone *et al.*, 1999; Kim dan Keeney, 1983, 1984; Porter *et al.*, 1991; Rigaud *et al.*, 1993), dan pengaruhnya terhadap cita rasa (Misnawi *et al.*, 2004a,b,c,d, 2003a; Bonvehi dan Coll, 2000).

## **1.2 Rumusan Masalah**

- a. Pada kadar berapa polifenol biji kakao dapat efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. mutans*?
- b. Bagaimana efektifitas polifenol biji kakao dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. mutans* dibandingkan dengan Chkm, Eugenol, dan Cresophene ?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

- a. Mengetahui kadar polifenol yang efektif untuk menghambat bakteri *S. mutans*.
- b. Mengetahui efektifitas polifenol biji kakao dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. mutans* jika dibandingkan dengan Chkm, Eugenol, dan Cresophene.

#### **1.4 Manfaat Penelitian**

- a. Dapat memberikan masukan terhadap ilmu pengetahuan tentang pengaruh pemberian polifenol biji kakao terhadap pertumbuhan *S. mutans*.
- b. Dengan mengetahui keefektifan polifenol biji kakao dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. mutans*, diharapkan polifenol biji kakao dapat dimasukkan ke dalam bahan makanan maupun pasta gigi untuk pencegahan karies gigi.
- c. Dapat digunakan sebagai bahan untuk studi intervensi selanjutnya dalam memaksimalkan polifenol biji kakao apabila penelitian ini terbukti dapat menghambat pertumbuhan *S. mutans*.
- d. Sebagai bahan alternatif untuk menggantikan Chkm, Eugenol, dan Cresophene jika terbukti lebih efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. mutans*.

## **BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA**

### **2.1 Kakao**

#### 2.1.1 Klasifikasi

Menurut Syamsulbahri (dalam Setiadevi, 2010), sistematika tanaman kakao berdasarkan klasifikasi secara botani adalah:

Divisi	: Spermatophyta
Klas	: Dicotyledonae
Ordo	: Malvales
Family	: Sterculiaceae
Genus	: <i>Theobroma</i>
Species	: <i>Theobroma cacao L.</i>

#### 2.1.2 Jenis Kakao

Jenis kakao secara skematis dapat dikelompokkan sebagai berikut: (1) Criollo, merupakan tanaman kakao yang memiliki mutu tinggi, hampir seluruh biji berwarna putih dan fermentasinya begitu cepat. Tunas-tunas mudanya berbulu dan daunnya relatif kecil. Kulit buah tipis dan mudah diiris serta dapat ditanam di tempat yang memiliki ketinggian 120 meter dari permukaan air laut; (2) Forastero, Mutunya yang rendah sering disebut kakao bulk. Biji gepeng dan selalu ungu, tunas-tunasnya yang berbulu, kulit buah keras dan sulit untuk diiris; (3) Trinitario, merupakan buah hasil persilangan alami antara Criollo dan Forastero. Trinitario banyak terdapat di daerah sungai Orinoca di sungai Amazone (Sunaryo dan Situmorang dalam Setiadevi, 2010).

#### 2.1.3 Morfologi Kakao

Bentuk buah dan warna kulit buah kakao sangat bervariasi, tergantung pada kultivanya. Pada dasarnya hanya ada dua macam warna, yaitu: (1) Buah yang muda

berwarna hijau/ hijau agak putih, bila sudah masak berwarna kuning; (2) Buah yang masih muda berwarna merah, bila sudah masak berwarna oranye (Sunanto, 1992).

Buah kakao akan masak setelah berumur 5-6 bulan, tergantung pada elevasi tempat penanaman. Saat buah masak, ukuran buah yang terbentuk cukup beragam dengan ukuran berkisar 10-30 cm, diameter 7-15 cm, tergantung pada kultivar dan faktor-faktor lingkungan selama proses perkembangan buah (Sunanto, 1992).

#### 2.1.4 Biji Kakao

Buah kakao terdiri atas tiga komponen penyusun utama, yaitu kulit buah, plasenta, dan biji. Kulit buah merupakan komponen terbesar dari buah kakao, yaitu lebih dari 70% berat buah masak. Presentase biji kakao di dalam buah hanya sekitar 27-29%, sedangkan sisanya adalah plasenta yang merupakan pengikat dari 30-40 biji. Dalam setiap buah terdapat sekitar 20-50 butir biji yang tersusun dalam lima baris dan menyatu pada bagian poros buah (Sunanto, 1992). Pada buah kakao muda, biji menempel pada kulit bagian dalam, tetapi bila buah masak, maka biji akan lepas dari kulit buah dan akan berbunyi bila digoncang. Permukaan biji kakao diselimuti pulp berwarna putih. Pulp merupakan jaringan halus berlendir dan melekat ketat pada biji kakao. Biji kakao yang berasal dari buah yang matang mempunyai pulp yang lunak dan manis. Biji kakao terdiri dari kulit biji, dua kotiledon, dan embrio yang terdiri dari epikotil, hipokotil, dan radikula (Mulato dan Widyotomo dalam Setiadevi, 2010).

Biji kakao yang tidak difermentasi berciri-ciri tekstur pejal, berwarna *slaty* atau ungu keabu-abuan, serta memiliki rasa pahit dan sepat. Komposisi kimia biji kakao sebelum difermentasi dapat dilihat pada Tabel 2.1 (Setiadevi, 2010).

Tabel 2.1 Komposisi kimia biji kakao

No.	Bahan	Keping biji (%)	Kulit biji (%)
1.	Air	2,1	3,8
2.	Lemak	54,7	3,4
3.	Abu	2,7	8,1
4.	Nitrogen		
	• Total N	2,2	2,8
	• Protein	1,3	2,1
	• Theobromin	1,4	1,3
	• Cafein	0,7	0,1
5.	Karbohidrat		
	• Glukosa	0,1	0,1
	• Sukrosa	-	-
	• Pati	6,1	-
	• Selulosa	1,9	15,7
	• Serat kasar	2,1	18,6
	• Pentaosa	1,2	7,1
6.	Tannin		
	• Asam tanat	2,0	1,3
	• Cocoa purple	4,2	2,0
7.	Asam organik		
	• Asam asetat	0,1	0,1
	• Asam sitrat	-	-
	• Asam oksalat	0,2	0,3

Sumber: Rohan dalam Setiadevi (2010)

#### 2.1.5 Ekstraksi Lemak Kakao

Biji kakao (Gambar 2.1) memiliki kandungan lemak nabati yang tinggi, sekitar 50%. Lemak biji kakao terdiri dari tujuh macam asam lemak, asam palmitat 24,8%, asam stearat 33%, asam oleat 33,1%, 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. Lemak kakao adalah lemak alami yang diperoleh dari nib kakao (kotiledon), merupakan campuran trigliserida,

yaitu senyawa gliserol dan tiga asam lemak. Lebih dari 70% dari gliserida penyusun tersebut terdiri dari tiga senyawa tak jenuh tunggal, yaitu *oleodipalmitin* (POP), *oleodistearin* (SOS), dan *oleopalmitearin* (POS). Di dalam lemak buah kakao juga terdapat sedikit *unsaturated trigliserida* (Misnawi *et al.*, 2002a,b).



Gambar 2.1 Biji kakao (Sumber: Suryani, 2010)

Ada tiga cara ekstraksi lemak kakao, yaitu pengempaan hidrolis, pengempaan ulir (*expeller press*) dan ekstraksi pelarut. Lemak kakao berkualitas baik berasal dari nib yang baik dan biasanya diperoleh dengan pengempaan hidrolis. Lemak kakao yang berasal dari pengempaan ulir pada nib bermutu rendah/ campuran nib dengan kulit halus serta yang berasal dari ekstraksi pelarut terhadap bungkil kakao biasanya memiliki mutu yang rendah (Mulato dan Widyotomo dalam Setiadevi, 2010).

Penghancuran dan penghalusan nib bertujuan untuk mempermudah ekstraksi lemak kakao dan penepungan bungkil kakao. Hasil proses ini berupa pasta kakao. Tingkat kehalusan pasta kakao sangat berpengaruh terhadap kecepatan dan hasil ekstraksi lemak serta mutu bungkil kakao yang diperoleh. Semakin halus pasta kakao, semakin baik pula bungkil kakao dan semakin baik juga mutu bubuk kakao yang akan diperoleh. Pengepresan pasta kakao dilakukan sampai bagian cair berupa lemak keluar dan bagian padat tertinggal (Mulato dan Widyotomo dalam Setiadevi, 2010).

## 2.2 Polifenol

Polifenol merupakan senyawa yang tersusun dari banyak senyawa fenol. Fenol merupakan senyawa non gizi yang mempunyai minimal satu cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksil, sedangkan senyawa polifenol mempunyai lebih dari satu cincin aromatik. Sumber senyawa polifenol adalah teh, kopi, buah-buahan, minyak zaitun, cinnamon, dan sebagainya. Keberadaan polifenol selain bertanggung jawab pada pembentukan rasa pahit dan sepat, tetapi juga menyebabkan karakteristik warna coklat dari biji kakao terfermentasi (Prayoga, 2010).

Selama fermentasi berlangsung, polifenol membentuk kompleks kuat dengan protein. Tannin terkondensasi dihasilkan melalui polimerisasi flavonoid dan banyak terdapat pada tanaman kayu yaitu pada lapisan biji. Tanin dapat bersifat sebagai antioksidan karena kemampuannya dalam menstabilkan fraksi lipid dan keaktifannya dalam penghambatan lipoksigenase (Zeeuthen dan Sorensen dalam Prayoga, 2010).

### 2.2.1 Ekstraksi Polifenol Kakao

Metode ekstraksi yang banyak digunakan adalah distilasi dan ekstraksi dengan pelarut. Proses ekstraksi dipengaruhi lama ekstraksi, suhu, dan juga jenis pelarut yang digunakan. Semakin lama waktu yang digunakan dan semakin tinggi suhu yang akan digunakan juga maka semakin sempurna proses ekstraksi. Sedangkan semakin dekat tingkat kepolaran pelarut dengan komponen yang diekstrak maka semakin sempurna proses ekstraksi (Prayoga, 2010).

Pelarut yang digunakan untuk teknik ekstraksi polifenol ialah pelarut organik yaitu air dan alkohol 70%. Hal-hal yang perlu diperhatikan mengenai pelarut adalah: (1) Pelarut polar akan melarutkan senyawa polar; (2) Pelarut organik akan cenderung melarutkan senyawa organik; (3) Pelarut air akan cenderung melarutkan senyawa anorganik dan garam dari asam ataupun basa (Achmadi dalam Prayoga, 2010).

Prinsip ekstraksi menggunakan pelarut organik ialah bahan yang akan diekstrak dikontakkan langsung dengan pelarut selama selang waktu tertentu hingga komponen yang akan diekstrak larut. Kemudian pemisahan bahan pelarut dari bahan yang telah



diekstrak. Sistem pelarut yang digunakan dalam ekstraksi harus dipilih berdasarkan kemampuan pelarut dalam melarutkan jumlah yang maksimum dari zat aktif dan seminimal mungkin bagi unsur yang tidak diinginkan (Ansel dalam Prayoga, 2010).

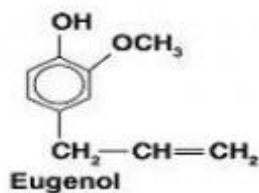
Teknik ekstraksi polifenol biji kakao yang digunakan dalam penelitian ini ialah dengan cara, biji kakao basah yang telah dipisahkan plasentanya menggunakan air kemudian dikeringkan dengan sinar matahari selama 7 jam, lalu dilanjutkan dengan pengeringan oven dengan suhu 50 °C sampai kadar air 7,5%. Selanjutnya biji kakao yang telah kering dihaluskan dengan blender untuk kemudian dipisahkan lemaknya (*defatting*) dengan pengepresan sistem hidrolik dan perendaman menggunakan bahan pelarut petroleum benzen (titik didih 40-60 °C) selama 3 jam. Dari proses pemisahan lemak ini dihasilkan bubuk biji kakao bebas lemak (Harmawan, 2010).

## 2.3 Bahan Pembanding Sifat Antibakteri

### 2.3.1 Eugenol

Eugenol merupakan cairan yang tidak berwarna atau berwarna kuning-pucat. Eugenol dapat larut dalam alkohol, eter dan kloroform. Eugenol mempunyai rumus molekul  $C_{10}H_{12}O_2$  dan memiliki bobot molekul sebesar 164,20 serta titik didih pada suhu 250 -255°C. Rumus kimia eugenol dapat dilihat pada Gambar 2.2 (Bulan, 2004).

Eugenol merupakan esens kimiawi minyak cengkeh dan mempunyai hubungan dengan fenol dan memiliki sifat yang lebih mengiritasi dibandingkan dengan minyak cengkeh. Kedua bahan ini merupakan bahan antiseptik dan bahan anodin. Eugenol ini memiliki sifat yang sedatif (Walton dan Torabinejad, 1998).



Gambar 2.2 Rumus kimia eugenol (Sumber: Zulfikar, 2010)

Eugenol merupakan salah satu turunan dari senyawa fenol yang potensial serta memiliki daya antibakteri. Mekanisme antibakteri eugenol berkaitan dengan interaksi pada membran sel, dimana menyebabkan kehancuran pada membran sel. Eugenol berpotensi mengakibatkan perubahan permeabilitas dinding sel sampai pada batas tertentu dan akan mengakibatkan kebocoran ion potasium. Kebocoran ion potasium merupakan indikator awal terjadinya kerusakan membran sel. Selain itu, diketahui bahwa eugenol juga menghambat peningkatan level ATP yang terjadi, sehingga dapat mengakibatkan penurunan ATP sebagai sumber energi sel (Anonim, 2011).

### 2.3.2 Cresophene

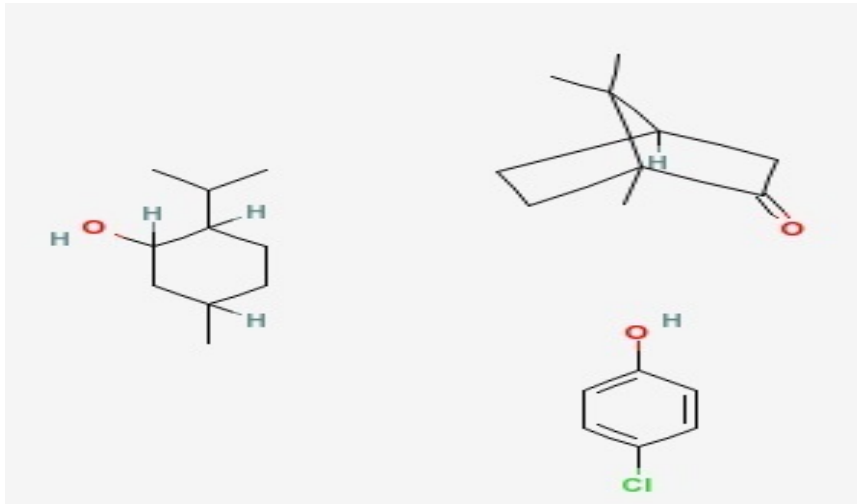
Cresophene merupakan senyawa yang terdiri dari chlorophenol, dexametasone hexachlorophene, dan thymol yang berfungsi sebagai antiplogisticum. Cresophene digunakan pada kondisi periodontitis akut yang disebabkan karena penggunaan alat kedokteran gigi yang berlebihan (Walton dan Torabinejad, 1998).

Cresophene mempunyai fungsi sebagai bahan antibakterisida yang kuat. Sifat antibakterisida disebabkan adanya bahan antiseptik yang terkandung didalamnya, antara lain: parachlorophenol dengan kortikosteroid yang memiliki sedikit efek iritasi, dan deksametasone yang merupakan kortikosteroid efektif dengan lebih sedikit inflamasi dibandingkan dengan hidrokortison (Walton dan Torabinejad, 1998).

### 2.3.3 Chkm (Chlorophenol Kamfer Menthol)

Chkm merupakan senyawa yang terdiri dari dua bagian paraklorofenol dan tiga bagian kamfer (Gambar 2.3). Chkm memiliki sifat desinfektan yang dapat mengiritasi jaringan lebih kecil daripada formokresol. Senyawa ini memiliki spektrum antibakteri yang luas dan sangat efektif sebagai antijamur. Bahan utamanya yaitu paraklorofenol dapat memusnahkan berbagai mikroorganisme yang ada dalam saluran akar. Bahan pendampingnya yaitu kamfer berfungsi sebagai bahan pelarut dan dapat mengurangi efek iritasi yang terdapat dalam paraklorofenol. Kamfer juga dapat memperpanjang

efek antibakterial. Menthol dalam Chkm mampu mengurangi iritasi yang disebabkan oleh chlorophenol serta dapat mengurangi rasa sakit (Walton dan Torabinejad, 1998).



Gambar 2.3 Struktur kimia Chkm (Sumber: Alinis, 2011)

Senyawa fenol Kamfer yang dikenal sebagai “dana bakteri” dalam medis sudah digunakan sejak tahun 1880. Dalam kedokteran gigi, digunakan pada tahun 1905 oleh Otto Walkhoff. Dia sudah menggunakan klorin sejak tahun 1882 untuk pengobatan fenol direkomendasikan untuk gangren pulpa. Immig memberitahukan aplikasi fenol untuk penanganan gangren dan periodontitis dalam bentuk batu bara dengan kapas yang diberi Klorofenol dan Timol sebagai bahan pengisi saluran akar. Campuran yang digunakan mengandung 30-40% fenol, dan kamper 60-70% (Alinis, 2011).

Klorofenol cair dianggap sebagai desinfektan yang kuat. Bila digunakan dalam saluran akar dapat menembus jauh ke dalam dentin yang sudah terinfeksi bakteri sebelumnya, tetapi juga ke foramen apikal dan ke jaringan periapikal. Pengaruh fenol terhadap antibakteri mungkin berdasarkan kemampuan lipid dalam menghancurkan bakteri untuk membran. Pada konsentrasi yang tinggi dapat mendenaturasi protein sel. Pada konsentrasi yang lebih rendah sangat penting pada sistem enzim yang sudah dilemahkan dan dinding sel bakteri terlarut, sehingga bisa diasumsikan penambahan kapur barus, yang korosif dan pengaruh klorin yang beracun dapat dinetralkan oleh

fenol sebagian besar. Hanya dengan mencampur klorofenol:kapur barus dengan rasio 2:1 sekali lagi efek korosif menentukan. Hal ini dikarenakan kamper terlarut karena tambahan fenol. Akan tetapi bukti baru mengindikasikan kamper sendiri juga toksik dan dapat meningkatkan toksisitas (Alinis, 2011).

Timol ialah zat desinfektan yang memiliki kemampuan 30 kali lebih tinggi jika dibandingkan fenol, dengan toksisitas yang minimum, mutlak menunjukkan toksisitas timol mirip dengan fenol. Menurut Tronstad (dalam Alinis, 2011) efek antiseptik dari zat ini memiliki durasi yang relatif pendek. Hal ini dapat mengakibatkan jumlah dari mikroorganisme yang tersisa dalam saluran akar relatif cepat tumbuh lagi terutama ketika jaringan eksudat dan darah ada di sana (Alinis, 2011).

Diselidiki pada dentin manusia efek desinfektan terhadap *E.faecalis*. Hal ini terbukti Chkm merupakan desinfektan yang dapat mempengaruhi kalsium hidroksida. Kombinasi produk dan pengaruhnya terhadap *E. faecalis* ( $\text{Ca(OH)}_2$  faecalis ( $\text{Ca(OH)}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{Ca(OH)}_2 + 0,25\%$  Chlorhexidin, O,  $\text{Ca OH} + \text{CHKM}$ ). Kombinasi kalsium hidroksida dan CHKM dapat membunuh semua mikroorganisme ini.. Dalam studi mereka, bahkan setelah satu minggu efektif terhadap faecalis dan *F. nucleatum* dan kombinasi produk ini mampu membunuh semua bakteri dalam waktu 24 jam. Studi lain diperiksa kemampuan beberapa deposito obat dalam mencegah saluran akar terkontaminasi ulang. Di sini juga, terbukti kombinasi  $\text{Ca(OH)}_2$ -CHKM baik dan juga unggul sehingga reinfeksi saluran akar tidak lagi terjadi (Alinis, 2011).

## **2.4 Antibakteri**

### **2.4.1 Mekanisme Kerja Antibakteri**

Antimikroba merupakan obat pembasmi mikroba, khususnya mikroba yang bisa merugikan manusia. Obat yang akan digunakan untuk membasmi mikroba, penyebab infeksi pada manusia, harus memiliki sifat toksisitas selektif setinggi mungkin. Obat tersebut haruslah bersifat sangat toksik untuk mikroba tetapi relatif tidak toksik untuk hospes (Ganiswarna, 1995)

Berdasarkan mekanisme kerjanya antimikroba dibagi dalam 4 kelompok, yaitu:

a. Antibakteri yang menghambat sintesis dinding sel bakteri

Bakteri mempunyai lapisan luar sel yang kaku, yaitu dinding sel. Dinding sel mempertahankan bentuk dan ukuran mikroorganisme, yang mempunyai tekanan osmotik internal tinggi. Cedera pada dinding sel (misal karena lisozim) atau inhibisi pada pembentukannya dapat menyebabkan sel menjadi lisis. Dalam lingkungan hipertonik (misal sukrosa 20%), kerusakan pembentukan dinding sel mengakibatkan terbentuknya “protoplas” bakteri sferis pada organisme gram positif atau “sferoplas” pada organisme gram negatif; bentuk-bentuk tersebut dilapisi oleh membran sitoplasma yang rapuh. Jika protoplas atau sferoplas tersebut ditempatkan pada lingkungan dengan tonisitas normal, keduanya akan mengambil cairan secara cepat, membengkak, dan dapat pecah. Contoh-contoh agen yang bekerja dengan cara inhibisi sintesis dinding sel adalah penisilin, sefalosporin, vankomisin, dan sikloserin (Brooks *et al.*, 2007).

b. Antibakteri yang mengganggu permeabilitas membran sel mikroba

Sitoplasma membran sel yang hidup diikat oleh membran sitoplasma, yang akan bekerja sebagai barier permeabilitas selektif, berfungsi sebagai transpor aktif, sehingga mengontrol komposisi internal sel. Jika integritas fungsional membran sitoplasma terganggu, makromolekul dan ion dapat keluar dari sel sehingga dapat menyebabkan kerusakan atau kematian sel. Membran sitoplasma bakteri dan jamur mempunyai struktur yang berbeda dari sel-sel hewan dan dapat mudah dirusak oleh agen tertentu. Oleh karenanya, kemoterapi selektif mungkin untuk dilakukan. Contoh agen yang bekerja dengan cara inhibisi fungsi membran sel adalah amfoterisin B, kolistin, dan imidazol (Brooks *et al.*, 2007).

c. Antibakteri yang menghambat sintesis protein sel bakteri

Untuk kehidupannya bakteri perlu mensintesis berbagai protein. Sintesis protein berlangsung di ribosom, dengan bantuan mRNA dan tRNA. Pada bakteri, organel ribosom terdiri dari dua sub unit, yang berdasarkan konstanta sedimentasinya dinyatakan sebagai ribosom 30s dan 50s. Pada sintesis protein kedua komponen ini bersatu pada pangkal rantai mRNA menjadi ribosom 70s. Apabila zat anti

bakteri berikatan dengan komponen ribosom 30s pada mRNA akan dapat menyebabkan tRNA salah membaca kode tersebut sehingga akan terbentuk protein yang abnormal dan nonfungsional bagi sel bakteri. Contoh obat yang bekerja dengan cara menghambat sintesis protein adalah eritromisin, linkomisin, tetrasiklin, aminoglikosida, dan kloramfenikol (Brooks *et al.*, 2007).

- d. Antibakteri yang menghambat sintesis asam nukleat sel bakteri  
Asam nukleat merupakan bagian yang sangat vital bagi perkembangbiakan sel. Mekanisme kerjanya dengan cara berikatan dengan enzim polymerase-RNA (pada sub unit) sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA. Contoh obat yang bekerja dengan cara inhibisi sintesis asam nukleat adalah kuinolon, pirimetamin, rifampin, sulfonamid, trimetoprim, dan trimetreksat (Brooks *et al.*, 2007).

## **2.5 *Streptococcus mutans***

### 2.5.1 Taksonomi *S. mutans*

Klasifikasi dari *S. mutans* menurut Bergey (dalam Capuccino, 2001) adalah :

Kingdom	: Monera
Divisio	: Firmicutes
Class	: Bacilli
Order	: Lactobacilalles
Family	: Streptococcaceae
Genus	: <i>Streptococcus</i>
Species	: <i>Streptococcus mutans</i>

Berbagai unsur antigenik didapatkan didalam dinding sel bakteri *S. mutans*. Antigen-antigen tersebut akan menentukan imunogenitas *S. mutan*, seperti misalnya antigen protein, polisakarida spesifik, peptidoglikan, dan asam lipoterikoat. Bakteri utama penyebab terjadinya proses karies ialah *S. mutans* (Bachtiar, 1997).

Secara sederhana streptococcus oral dibedakan melalui tes biokimia dan tes fisiologi. Beberapa penelitian terkini membandingkan keseragaman DNA, struktur protein sel, deteksi aktivitas glycosidase menjelaskan hubungan taksonomi antara

banyak spesies. Streptococcus oral dibagi dalam empat kelompok spesies utama, yaitu: mutans group, salivarius group, anginosus group, mitis group (Marsh, 1999).

Secara serologis *S. mutans* dapat dibedakan menjadi 8 serotipe berdasarkan spesifitas karbohidrat pada dinding selnya. Serotipe a disebut *S. cricetus*, serotipe b disebut *S. ratius*, Serotipe c, e, dan f disebut *S. mutans*, serotipe d dan g disebut *S. cobrinus*, serotipe h yang disebut *S. downer*. Semua serotipe, kecuali *S. ratius*, akan mengekspresikan *major cell surface-associated* protein yang disebut antigen I atau antigen II, antigen B. *S. mutans* serotipe c dan *S. cobrinus* yang disebut *S. mutans* serotipe g dinyatakan sebagai agen etiologi karies yang utama. Bakteri golongan streptococcus mempunyai beberapa strain, tetapi yang dominan dan banyak sekali ditemukan dalam rongga mulut manusia adalah jenis *S. mutans* (strain c, e, f) dan *S. cobrinus* (strain d, g) (Brooks *et al.*, 2007).

Klasifikasi streptococcus berdasarkan reaksi hemolitik menurut Brooks *et al.* (2007) terdiri dari:

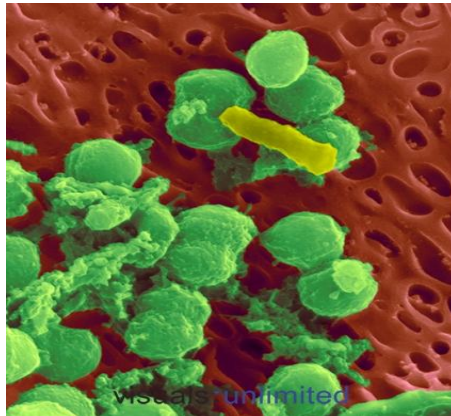
- a. *S. pyogenes* merupakan patogen utama pada manusia yang menimbulkan invasi lokal dan sistemik serta kelainan imunologi pasca infeksi streptococcus. Bakteri ini biasanya sensitif terhadap basitrasin. Sebagian besar streptococcus yang mengandung antigen grup A adalah *S. pyogenes*.
- b. *S. agalactiae* merupakan anggota flora normal dari traktus genitalis wanita dan penyebab penting sepsis dan meningitis neonatus. Organisme ini merupakan streptococcus grup B
- c. Grup C dan D kadang-kadang terdapat pada nasofaring dan dapat menyebabkan sinusitis, bakterimia atau endokarditis. Streptococcus grup C dan D sering terlihat seperti *S. pyogens* grup A pada medium agar darah. Organisme ini diidentifikasi melalui reaksi dengan antiserum spesifik untuk grup C atau G.
- d. *Enterococcus faecalis*, merupakan bagian dari flora normal usus. Enterococcus biasanya bersifat nonhemolitik dan kadang-kadang  $\alpha$  hemolitik. Banyak isolat enterococcus yang resisten terhadap vankomisin.

- e. *S. bovis* merupakan streptococcus grup D nonenterococcus. Mereka bagian dari flora normal usus. Kadang-kadang menyebabkan endokarditis, dan bakterimia pada pasien karsinoma kolon. *S. bovis* sering diklasifikasikan sebagai *S. viridans*.
- f. *S. anginosus* mempunyai nama lain *S. constellatus*, *S. intermedius*, dan *S. milleri*. Streptococcus ini merupakan bagian dari flora normal. Mereka dapat bersifat  $\beta$  hemolitik,  $\alpha$  hemolitik, atau nonhemolitik. Streptococcus jenis ini digolongkan sebagai *S. viridans*.
- g. Streptococcus grup N. Organisme ini jarang ditemukan pada penyakit manusia tetapi menyebabkan koagulasi normal (pengasaman) pada susu.
- h. Golongan E, F, G, H, dan K-U, streptococcus ini terutama terdapat pada hewan selain manusia dengan pengecualian yang telah disebutkan.
- i. *S. pneumoniae* merupakan pneumococcus bersifat  $\alpha$  hemolitik. Pertumbuhannya dihambat oleh optokin dan koloninya larut dalam empedu.
- j. *S. viridans* meliputi *S. salivarius*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. sanguis*, dan lain-lain. Ciri khas organisme ini adalah sifat  $\alpha$  hemolitik, tetapi dapat juga nonhemolitik. Pertumbuhannya tidak dihambat oleh optokin, dan koloninya tidak larut dalam empedu. *S. viridans* merupakan anggota dari flora normal yang paling banyak ditemukan di saluran napas atas dan penting untuk menjaga kesehatan membran mukosanya. Organisme ini dapat masuk ke peredaran darah karena trauma dan menjadi penyebab utama endokarditis pada katup jantung yang abnormal. Beberapa *S. viridans* (misalnya *S. mutans*) mensintesis polisakarida besar seperti dekstran atau levans dari sukrosa dan juga berperan penting pada pembentukan karies gigi, lihat Gambar 2.4.
- k. Streptococcus varian secara nutrisi. Streptococcus jenis ini biasa dikenal sebagai “streptococcus defisiensi nutrisi”, “streptococcus dependen piridoksal”, dan nama lainnya. Organisme ini membutuhkan piridoksal atau sistein untuk tumbuh di agar darah atau tumbuh sebagai koloni satelit di sekitar koloni stafilococcus dan bakteri lain. Kelompok ini biasanya bersifat  $\alpha$  hemolitik tetapi dapat juga nonhemolitik. Mereka merupakan bagian dari flora normal dan kadang-kadang



menyebabkan bakterimia atau endokarditis serta dapat ditemukan pada abses otak dan infeksi lain. Pemberian suplementasi medium agar darah dengan piridoksil memungkinkan penemuan kembali organisme ini

1. *Peptostreptococcus*. Streptococcus ini hanya tumbuh dalam kondisi anaerobik atau mikroaerofilik dan menghasilkan berbagai hemolisin. Streptococcus ini adalah bagian flora normal mulut, saluran nafas atas, usus, dan traktus genitalia perempuan. Organisme ini bersama-sama dengan berbagai spesies bakteri lain sering menimbulkan infeksi bakteri campuran di abdomen, pelvis, paru, dan otak.



Gambar 2.4 Koloni *S. mutans* pada epitel lidah (Sumber: Kunkel, 2010)

### 2.5.2 Morfologi *S. mutans*

Dua bentuk didapatkan pada bakteri *S. mutans* yakni coccus atau bulat dan berpasangan menyerupai rantai. Apabila sendirian bakteri ini memiliki bentuk coccus dan bulat telur apabila tersusun dalam rantai. Secara khas *S. mutans* berbentuk bulat yang membentuk pasangan atau rantai selama masa pertumbuhannya dengan diameter sel 0,5- 0,7  $\mu\text{m}$  (Brooks *et al.*, 2007). Bakteri *S. mutans* memiliki kecenderungan berbentuk coccus dengan formasi rantai panjang apabila ditanam pada medium yang diperkaya seperti pada *Brain Heart Infusion (BHI) Broth*, sedangkan bila ditanam di media agar memperlihatkan rantai pendek dengan bentuk sel tidak beraturan (Michalek dan McGee dalam Pratama, 2005).

*Bakteri S. mutans* merupakan bakteri gram positif, bersifat nonmotil, dan merupakan bakteri anaerob fakultatif. Bakteri ini tersebar luas di alam dan beberapa diantaranya merupakan flora normal yang terdapat dalam tubuh manusia (Brooks *et al.*, 2007). Bila lingkungan menguntungkan dan terjadi peningkatan populasi *S. mutans* dapat berubah menjadi patogen (Kidd dan Bechal dalam Inayati, 2008).

Bakteri *S. mutans* telah diisolasi dari rongga mulut dan hewan percobaan termasuk tikus dan rongga mulut manusia (Nolte dalam Dewi, 2009). Bakteri ini tumbuh secara optimal pada suhu 18<sup>0</sup> - 40<sup>0</sup> Celsius. Bakteri *S. mutans* biasanya ditemukan pada rongga gigi manusia (Nugraha, 2008).

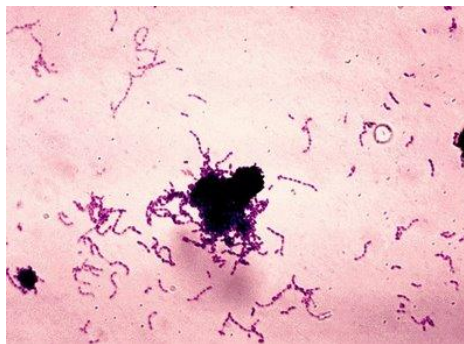
### 2.5.3 Habitat *S. mutans*

Habitat utama *S. mutans* ialah permukaan gigi. Bakteri ini tidak dapat tumbuh secara menyeluruh pada permukaan gigi, tetapi sering tumbuh pada area tertentu di permukaan gigi. Biasanya kita dapat menemukan koloni *S. mutans* dalam pit dan fisur, permukaan oklusal, area proksimal gigi, gingiva atau pada lesi karies gigi. Koloni kuman ini memerlukan permukaan yang tidak deskuamatik, karena itu didalam mulut pertama kali ditemukan pada plak gigi. Jumlah populasi *S. mutans* dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu: sukrosa, topikal aplikasi fluor, penggunaan antibiotik, obat kumur dengan antiseptik dan *oral hygiene* (Nugraha, 2008).

Michalek dan Mc Ghee (dalam Pratama, 2005) serta Nolte (dalam Dewi, 2009) menyatakan bahwa media selektif untuk pertumbuhan *S. mutans* adalah agar *Mitis Salivarius*, yang menghambat kebanyakan bakteri mulut lainnya kecuali streptococcus. Penghambatan pertumbuhan bakteri mulut lainnya pada agar *Mitis Salivarius* disebabkan karena kadar biru *trypan*. Media ini juga mengandung membran violet, telurit dan sukrosa berkadar tinggi. Pertumbuhan bakteri *S. mutans* pada agar *Mitis Salivarius* memperlihatkan bentuk koloni halus berdiameter 0,5 – 1,5 mm, cembung, berwarna biru tua dan pada pinggiran koloni kasar serta berair membentuk genangan di sekitarnya (Michalek dan Mc Ghee dalam Pratama, 2005).

Pertumbuhan *S. mutans* menjadi kurang subur pada perbenihan padat atau kaldu, kecuali diperkaya darah atau cairan jaringan (Brooks *et al.*, 2007). Media lain yang dapat dipakai untuk menumbuhkan *S. mutans* adalah *Brain Heart Infusion Broth (BHI-B)*, *Trypton Yeast Cystein (TYC)* dan agar darah (Sukanto *et al.*, 2002). Sebagian besar streptococcus tumbuh dalam media padat sebagai koloni diskoid, mempunyai diameter 1-2 mm (Gambar 2.5). Strain yang sering menghasilkan bahan kapsular sering membentuk koloni mukoid. *Peptostreptococcus* merupakan obligat anaerob (Brooks *et al.*, 2007).

Menurut Nolte (dalam Dewi, 2009) dalam keadaan anaerob, bakteri ini memerlukan 5% CO<sub>2</sub> dan 95% nitrogen serta memerlukan membran sebagai sumber nitronen agar dapat bertahan hidup dalam lapisan plak yang tebal. (Pratama, 2005). Pada pertumbuhannya secara anaerob, *S. mutans* dapat menggunakan amoniak sebagai satu-satunya sumber nitrogen. Hasil fermentasi dari glukosa termasuk *lactate*, *acetate*, *ethanol* dan *formate* pada kultur anaerob dan *seton* pada kultur aerob. Berbeda dengan kebanyakan streptococcus mulut lainnya, manitol dan sorbitol tidak difermentasikan oleh semua bakteri *S. mutans* (Nolte dalam Dewi, 2009).



Gambar 2.5 Gambaran mikroskopis koloni *S. mutans* (Sumber: Alicia, 2010)

#### 2.5.4 Patogenitas *S. mutans*

Agen utama pada karies gigi ialah *S. mutans*, namun tanpa adanya faktor lain seperti sukrosa, bakteri ini tidak dapat menyebabkan karies (Samaranayake, 2002). Enzim yang dihasilkan bakteri *S. mutans*, yaitu *glukosiltransferase* dan *fruktosil transferase*. Enzim-enzim ini bersifat spesifik untuk substrat sukrosa yang digunakan

untuk sintesa glukukan dan fruktan. Pada metabolisme karbohidrat, enzim *glikosiltransferase* menggunakan sukrosa untuk mensintesa molekul glukosa dengan berat molekul tinggi yang terdiri dari ikatan glukosa alfa (1-6) dan alfa (1-3) (Michalek dan McGee dalam Pratama, 2005). Ikatan glukosa alfa (1-3) sangat pekat seperti lumpur, lengket dan tidak larut dalam air. Kelarutan ikatan glukosa alfa (1-3) dalam air berpengaruh terhadap pembentukan koloni *S. mutans* pada permukaan gigi (Roeslan dan Melanie dalam Pratama, 2005). Ikatan glukosa alfa (1-3) berfungsi membantu perlekatan koloni bakteri satu sama lain pada enamel yang erat kaitannya dengan pembentukan plak dan terjadinya karies gigi (Samarayanake, 2002).

Karies gigi adalah salah satu kerusakan gigi yang dimulai dari permukaan gigi dan berkembang ke arah dalam. Mula-mula permukaan email yang keseluruhannya nonselular mengalami demineralisasi. Hal ini terjadi akibat pengaruh asam hasil peragian bakteri. Dekomposisi dentin dan sementum yang terjadi selanjutnya akan meliputi pencernaan matriks protein oleh bakteri. Langkah pertama yang penting dalam karies adalah pembentukan plak pada permukaan email yang keras dan halus. Plak ini terdiri dari endapan gelatin dari glukukan yang mempunyai berat molekul besar, di sini bakteri penghasil asam melekat pada email polimer karbohidrat (glukan) terutama dihasilkan oleh streptococcus (*S. mutans*, *Peptostreptococcus*) yang dapat bekerja sama dengan *Actinomyces* (Mars, 1999).

Miller (dalam Marsh, 1999) menunjukkan bahwa bakteri rongga mulut dapat mengubah karbohidrat menjadi asam yang kemudian melarutkan kalsiumfosfat pada email sehingga menghasilkan lesi karies. Walaupun Clarke mengisolasi organisme yang kemudian disebut *S. mutans* dari lesi karies manusia pada tahun 1984, bukti nyata dalam *S. mutans* bersifat kariogenik baru ada pada tahun 1950 dan 1960 dimana terdapat eksperimen percobaan bebas kuman (Marsh, 1999).

Bakteri *S. mutans* bersifat asidogenik yaitu menghasilkan asam, asidodurik, mampu tinggal pada lingkungan asam, dan menghasilkan suatu polisakarida yang lengket disebut *dextran*. Oleh karena kemampuan ini, *S. mutans* bisa menyebabkan lengket dan mendukung bakteri lain menuju ke email gigi, lengket mendukung

bakteri-bakteri lain, pertumbuhan bakteri asidodurik yang lainnya, dan asam melarutkan e-mail gigi (Nugraha, 2008). Sifat bakteri *S. mutans* ialah asidogenik karena *S. mutans* mampu menghasilkan  $\text{pH} < 5$  dalam waktu 1-3 menit bila dibandingkan dengan bakteri lainnya (Kidd dan Bechal dalam Inayati, 2008).

Protein berperan penting dalam proses karies gigi, protein tersebut dapat berperan sebagai antigen maupun enzim. Protein antigen yang dianggap berperan dalam adhesi *S. mutans* adalah I/II yang berasal dari *S. mutans* serotipe c. Protein tersebut dianggap sebagai reseptor untuk aglutinin saliva. Selain protein yang berfungsi sebagai molekul adhesi atau reseptor, pada dinding *S. mutans* terdapat protein lain yang berfungsi sebagai enzim. Enzim tersebut adalah glukosiltransferase yang berfungsi mengubah sukrosa menjadi glukananin (Bachtiar, 1997).

## **BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN**

### **3.1. Jenis Penelitian**

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris. Rancangan penelitian ini diukur pengaruh pada kelompok perlakuan dengan membandingkan kelompok tersebut dengan kontrol (Notoatmodjo, 2003).

### **3.2. Waktu dan Tempat Penelitian**

#### 3.2.1. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli-Agustus 2011.

#### 3.2.2. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

### **3.3. Sampel Penelitian**

Sampel penelitian yang digunakan adalah *S. mutans* galur murni jenis ATCC strain 2517 dengan pengulangan 4 kali menurut perhitungan Daniel (lampiran A).

### **3.4. Identifikasi Variabel**

#### 3.4.1. Variabel Bebas

Polifenol biji kakao dengan berbagai konsentrasi, Eugenol, Chkm, Cresophene, dan *S. mutans*.

#### 3.4.2. Variabel Terikat

Pertumbuhan *S. mutans* dan efek antibakteri polifenol biji kakao.

### 3.4.3. Variabel Terkendali

- a. Kriteria sampel penelitian
- b. Alat dan bahan
- c. Konsentrasi polifenol biji kakao
- d. Sterilisasi alat dan bahan

## 3.5. Definisi Operasional

### 3.5.1. Polifenol Biji Kakao

Polifenol merupakan bahan aktif yang berupa fenol yang didapat dari ekstrak biji kakao dengan metode tertentu. Pada penelitian ini, polifenol biji kakao didapat dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia dengan kadar 100%. Konsentrasi polifenol biji kakao yang dipakai dalam penelitian ini ialah konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%. Teknik ekstraksi polifenol biji kakao yang digunakan dalam penelitian ini ialah dengan cara, biji kakao basah yang telah dipisahkan plasentanya menggunakan air kemudian dikeringkan dengan sinar matahari selama 7 jam, dilanjutkan dengan pengeringan oven dengan suhu 50 °C sampai kadar air 7,5%. Selanjutnya biji kakao yang telah kering dihaluskan dengan blender kemudian dipisahkan lemaknya (defatting) dengan pengepresan sistem hidrolis dan perendaman dengan pelarut petroleum benzen (titik didih 40-60 °C) selama 3 jam. Dari proses pemisahan lemak ini dihasilkan bubuk biji kakao bebas lemak (Harmawan, 2010).

### 3.5.2. *Streptococcus mutans*

Bakteri *S. mutans* merupakan bakteri gram positif, nonmotil, anaerob fakultatif, berbentuk coccus dan bulat telur apabila tersusun dalam rantai. Pada penelitian ini memakai *S. mutans* jenis ATCC strain 2517 yang didapat dari laboratorium mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

### 3.5.3. Efek Antibakteri Polifenol Biji Kakao

Merupakan penilaian daya hambat polifenol biji kakao terhadap pertumbuhan bakteri *S. mutans* melalui uji difusi cakram (Brooks *et al.*, 2007).

## 3.6. Alat dan Bahan

### 3.6.1. Alat (lampiran B)

- |                         |                            |
|-------------------------|----------------------------|
| a. Cakram kertas filter | i. <i>Laminar flow</i>     |
| b. <i>Caliper</i>       | j. <i>Syringe</i>          |
| c. <i>Elenmeyer</i>     | k. <i>Gigaskrin</i>        |
| d. <i>Autoclave</i>     | l. <i>Pinset</i>           |
| e. <i>Desicator</i>     | m. <i>Spektrofotometer</i> |
| f. <i>Incubator</i>     | n. <i>Spatula</i>          |
| g. <i>Petridish</i>     | o. <i>Evaporator</i>       |
| h. Tabung reaksi        | p. Kertas label            |

### 3.6.2. Bahan (lampiran C)

- |                                 |  |
|---------------------------------|--|
| a. Ekstrak polifenol biji kakao | f. Bakteri yang dianalisis, <i>S. mutans</i>   |
| b. Chkm                         | g. Kultur : <i>Brain Heart Infusion Broth (BHI-B)</i> , <i>Brain Heart Infusion Agar (BHI-A)</i> |
| c. Eugenol                      |  |
| d. Cresophene                   |  |
| e. <i>Aquadest</i> steril       |  |

## 3.7. Cara Kerja Penelitian

### 3.7.1. Persiapan Polifenol Biji Kakao

- Pemisahan polifenol biji kakao menggunakan pelarut air dan alkohol. Pemisahan ini tidak dilakukan dalam penelitian ini, peneliti mendapat produk polifenol yang telah diekstrak dari biji kakao melalui proses ekstraksi polifenol biji kakao yang dilakukan oleh Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia.



- b. Pembuatan sediaan ekstrak polifenol biji kakao pada konsentrasi 25%, 50%, 75% dan 100% dengan diencerkan menggunakan akuades dan dicampur hingga homogen menggunakan *evaporator*.

### 3.7.2. Persiapan Bahan Pembanding Sifat Antibakteri

- a. Chkm yang digunakan menggunakan merek *camex*.
- b. Cresophene yang digunakan menggunakan merek *septodont*.
- c. Eugenol yang digunakan menggunakan merek *camex*.

Cakram kertas filter yang akan digunakan untuk media bahan selanjutnya akan dicelupkan ke dalam bahan-bahan tersebut selama 30 detik menggunakan pinset.

### 3.7.3. Pembuatan Media Kultur

- a. Pembuatan media BHI-B (*Brain Heart Infusion Broth*)
  - 1) 3,7 gram bubuk BHI-B dan 100 ml aquades steril dicampur dalam tabung elenmeyer.
  - 2) Diaduk dengan spatula sampai homogen.
  - 3) Dipanaskan hingga suhu 121°C.
  - 4) Disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.
- b. Pembuatan media BHI-A (*Brain Heart Infusion Agar*)
  - 1) 5,2 gram bubuk BHI-A dan 100 ml *aquadest* steril dicampur dalam tabung elenmeyer.
  - 2) Diaduk dengan spatula sampai homogen.
  - 3) Dipanaskan hingga suhu 121°C.
  - 4) Disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121 °C selama 15 menit.
  - 5) Dituangkan ke dalam petridish setebal 2mm.
  - 6) Didiamkan hingga agar BHI-A dingin dan membeku.
- c. Pembuatan suspensi bakteri *S. mutans*
  - 1) 1 ose *S. mutans* dicampur dengan 2 cc BHI-B didalam tabung reaksi.
  - 2) Tabung reaksi dimasukkan ke dalam *incubator* pada suhu 37°C, 24 jam.

- 3) Suspensi *S. mutans* diambil dari *incubator*.
- 4) Dikocok hingga homogen menggunakan spatula
- 5) Diukur tingkat kekeruhannya menggunakan *spektrofotometer* hingga didapatkan tingkat kekeruhan 0,5 MacFarland.
- 6) Suspensi bakteri diambil dari tabung reaksi dengan *syringe* sebanyak 0,5 ml.
- 7) Suspensi bakteri disuntikkan di atas media BHI-A.
- 8) Suspensi bakteri diratakan di atas media BHI-A menggunakan *gigaskrin*.
- 9) Didiamkan selama 15 menit.

#### 3.7.4. Metoda Uji Difusi Cakram

- a. Bagian bawah *petridish* yang berisi media BHI-A dibagi menjadi 8 daerah.
- b. Tiap daerah diberi identitas masing-masing obat menggunakan kertas label.
- c. 8 buah cakram kertas filter masing-masing dicelupkan ke dalam *aquadest*, Chkm, Cresophene, Eugenol, dan polifenol 25%, polifenol 50%, polifenol 75%, dan polifenol 100% menggunakan pinset selama 30 detik.
- d. 8 buah cakram tersebut diletakkan diatas media BHI-A yang telah diinokulasi dengan *S. mutans* sesuai dengan label yang tertera pada bagian bawah *petridish*.
- e. Setiap perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali.
- f. Dilakukan inkubasi dalam *desicator* pada suhu 37 °C selama 48 jam untuk mendapatkan suasana anaerob.
- g. Diameter zona jernih inhibisi di sekitar cakram diukur menggunakan *caliper*.
- h. Pengukuran dilakukan sebanyak 3 kali untuk masing-masing obat kemudian diambil rata-rata.
- i. Hasil pengukuran dianalisis.

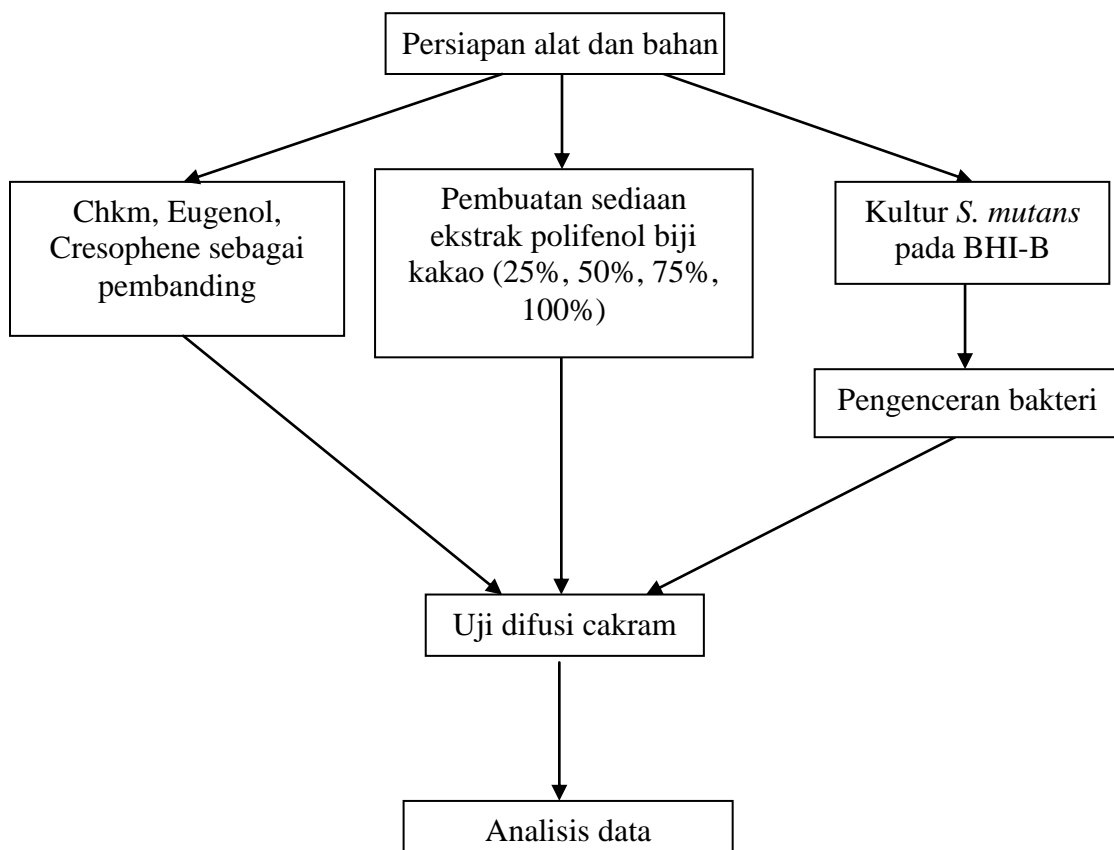
(Brooks *et al.*, 2007)

### 3.8. Metode Analisis Data

Data hasil penelitian ditabulasi dan diuji normalitasnya dengan test *Kormogorov-Smirnov* dan diuji homogenitasnya dengan uji *Levene*. Apabila data

yang ditemukan berdistribusi normal dan homogen maka selanjutnya data dianalisis dengan uji parametrik *One Way ANOVA* dengan tingkat kemaknaan 95% ( $p < 0,05$ ). Jika data yang didapatkan melalui uji beda *One Way ANOVA* mendapatkan perbedaan yang signifikan, maka dapat dilakukan uji lanjutan menggunakan *Tukey HSD* untuk mengetahui variabel-variabel yang mempunyai nilai beda yang signifikan ( $p < 0,05$ ).

### 3.9. Alur Penelitian



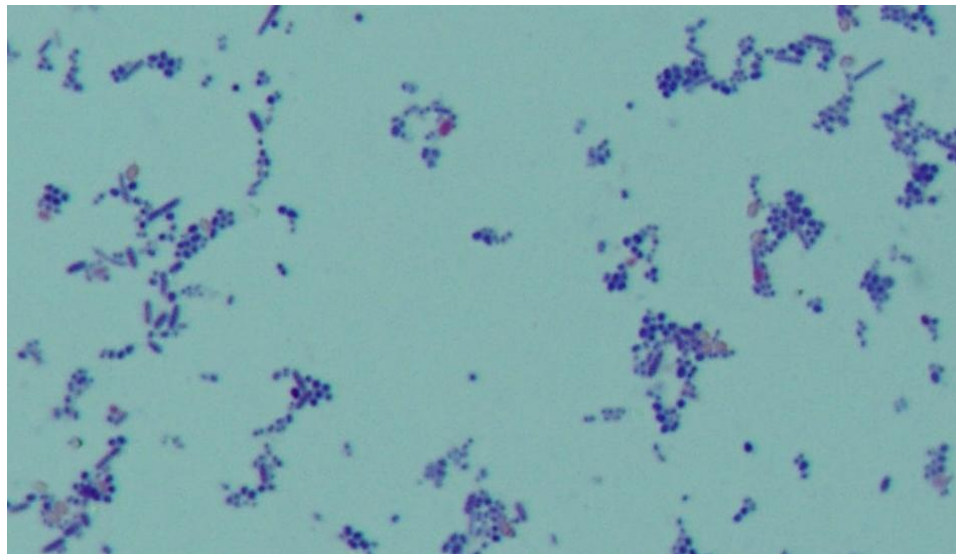
Gambar 3.1 Bagan alur penelitian

## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Hasil Penelitian

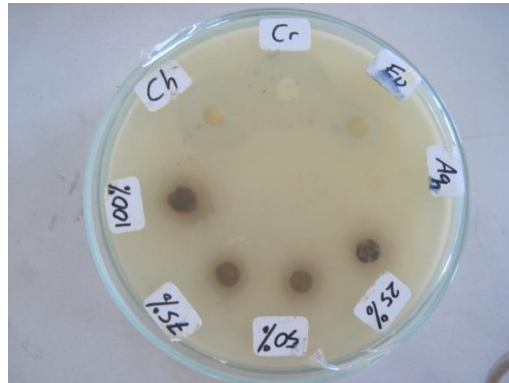
#### 4.1.1 Data Penelitian

Hasil penelitian yang telah dilaksanakan menggunakan polifenol 25%, polifenol 50%, polifenol 75%, polifenol 100%, *aquadest*, Chkm, Cresophene, dan Eugenol pada bakteri *S. mutans* (Gambar 4.1). Selanjutnya dilakukan pencatatan data dengan menggunakan *caliper* seperti tercantum dalam lampiran D dan rata-rata pengukuran dapat dilihat pada Tabel 4.1.



Gambar 4.1 Bakteri *S. mutans* dengan pengecatan gram

Bakteri yang akan diukur, sebelumnya dibiakkan dahulu melalui media biakan BHI-A (*Brain Heart Infusion Agar*) seperti pada Gambar 4.2. Hasil biakan kemudian dilakukan metode difusi antibakteri menggunakan polifenol 25%, 50%, 75%, dan 100%. Selain itu, juga digunakan bahan-bahan pembanding sifat antibakteri seperti Chkm, Cresophene, dan Eugenol.



(Ch) Chkm; (Cr) Cresophene; (Eu) Eugenol; (Aq) *Aquadest*; (25%) Polifenol 25%; (50%) Polifenol 50%; (75%) Polifenol 75%; (100%) Polifenol 100%

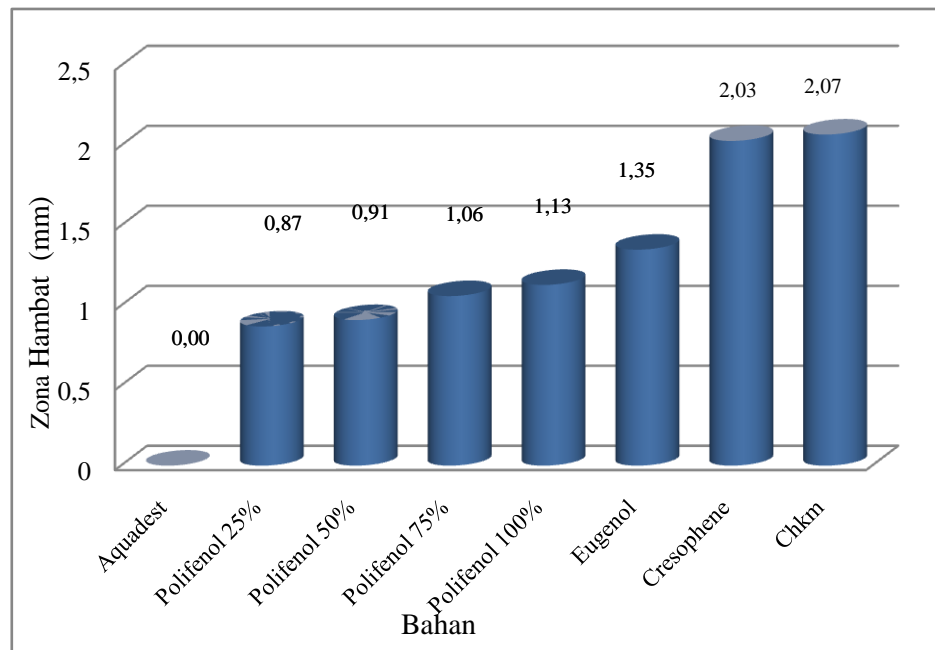
Gambar 4.2 Hasil uji kertas difusi cakram

Berdasarkan tabel 4.1 dapat diketahui bahwa *aquadest* sebagai kontrol negatif dapat menunjukkan nilai nol, diikuti dengan polifenol 25% yang memberikan zona hambat terhadap bakteri *S. mutans* sebesar  $0,87 \text{ cm} \pm 0,07$ , lalu polifenol 50% yang memberikan zona hambat  $0,91 \text{ cm} \pm 0,07$ , polifenol 75% yang memberikan zona hambat  $1,06 \text{ cm} \pm 0,07$ , polifenol 100% yang memberikan zona hambat  $1,13 \text{ cm} \pm 0,04$ , Eugenol yang memberikan zona hambat  $1,35 \text{ cm} \pm 0,06$ , lalu Cresophene yang memberikan zona hambat  $2,03 \text{ cm} \pm 0,10$ , dan terakhir zona hambat terbesar diberikan oleh Chkm dengan zona hambat  $2,07 \text{ cm} \pm 0,14$ .

Tabel 4.1 Rata-rata hasil pengukuran zona hambat

Bahan	Zona Hambat (cm)	Std. Deviasi
<i>Aquadest</i>	0,00	0,00
Polifenol 25%	0,87	0,07
Polifenol 50%	0,91	0,07
Polifenol 75%	1,06	0,07
Polifenol 100%	1,13	0,04
Chkm	2,07	0,14
Cresophene	2,03	0,10
Eugenol	1,35	0,06

Pada data hasil penelitian diatas menunjukkan bahwa polifenol biji kakao mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. mutans*, namun tidak sekuat Eugenol, Cresophene, dan Chkm (Gambar 4.3).



Gambar 4.3 Histogram rata-rata pengukuran zona hambat

#### 4.1.2 Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini diawali dengan analisis normalitas data dan kemudian dilanjutkan dengan analisis homogenitas data sebagai syarat sebelum melakukan uji beda *One Way ANOVA*.

Uji normalitas data dilakukan dengan menggunakan uji normalitas *Kolmogorov-smirnov* yang bertujuan untuk melihat apakah data yang diperoleh melalui penelitian ini berdistribusi normal atau tidak. Hasil dari uji normalitas data (Lampiran E.2) menunjukkan bahwa data yang didapat dari hasil penelitian ini memiliki nilai signifikansi 0,32 ( $p > 0,05$ ), hal ini menunjukkan bahwa data hasil penelitian ini memiliki distribusi normal.

Uji selanjutnya adalah uji homogenitas data dengan menggunakan uji *Levene test* dengan  $p > 0,05$  (Lampiran E.3). Uji homogenitas ini dilakukan untuk mengetahui apakah data yang didapat dari hasil penelitian ini homogen atau tidak. Data yang homogen diperlukan sebagai syarat dalam uji beda *One Way ANOVA* yang akan dilakukan selanjutnya. Berdasarkan uji *Levene test* yang telah dilakukan, dapat diketahui bahwa nilai signifikansinya sebesar 0,219 ( $p > 0,05$ ), hal ini membuktikan bahwa data yang didapat dari penelitian tersebut adalah homogen.

Setelah data diketahui berdistribusi normal dan homogen, maka selanjutnya data telah memenuhi syarat untuk diuji secara parametrik menggunakan uji *One Way ANOVA* (Lampiran E.4). Uji *One Way ANOVA* ini digunakan untuk mengetahui apakah ada perbedaan yang signifikan antara masing-masing variable yang diujikan terhadap pertumbuhan bakteri *S. mutans*. Tingkat kemaknaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 95% ( $p < 0,05$ ).

Berdasarkan uji beda *One Way ANOVA* yang telah dilakukan, maka dapat diketahui bahwa signifikansi data antar variable memiliki signifikansi 0,00 ( $p < 0,05$ ). Hal ini berarti bahwa lebih dari satu variable hasil penelitian yang telah dilakukan tersebut memiliki perbedaan yang bermakna dibandingkan dengan masing-masing variable yang diteliti sifatnya dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. mutans*.

Data yang telah diuji menggunakan uji beda *One Way ANOVA* dilanjutkan dengan uji lanjutan *Tukey HSD* untuk mengetahui variabel-variabel yang memiliki beda dan yang tidak memiliki beda secara signifikan.

Berdasarkan uji lanjutan *Tukey HSD* yang dilakukan (Tabel 4.2) dapat diketahui bahwa beda antar variabel-variabel yang diuji menunjukkan hasil yang signifikan ( $p < 0,05$ ), kecuali antara variabel polifenol 25% dengan polifenol 50%, variabel polifenol 50% dengan polifenol 75%, variabel 75% dengan polifenol 100%, dan variabel Chkm dengan Cresophene tidak menunjukkan beda yang signifikan.

Tabel 4.2 Hasil uji lanjutan *Tukey HSD* (lampiran E.5)

Kombinasi	Aq	25%	50%	75%	100%	Ch	Cr	Eu
Aq	-	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
25%	0,000*	-	0,998	0,043*	0,003*	0,000*	0,000*	0,000*
50%	0,000*	0,998	-	0,150	0,014*	0,000*	0,000*	0,000*
75%	0,000*	0,043*	0,150	-	0,951	0,000*	0,000*	0,001*
100%	0,000*	0,003*	0,014*	0,951	-	0,000*	0,000*	0,013*
Ch	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	-	0,996	0,000*
Cr	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,996	-	0,000*
Eu	0,000*	0,000*	0,000*	0,001*	0,013*	0,000*	0,000*	-

\* = Berbeda bermakna ( $p < 0,05$ )

(Aq) *Aquadest*; (25%) Polifenol 25%; (50%) Polifenol 50%; (75%) Polifenol 75%; (100%) Polifenol 100%; (Ch) Chkm; (Cr) Cresophene; (Eu) Eugenol

## 4.2 Pembahasan

Berdasarkan data hasil penelitian yang telah diuji statistik menunjukkan bahwa terdapat kemampuan polifenol dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. mutans* dibandingkan dengan kontrol menggunakan *aquadest*. Polifenol 100% mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. mutans*  $1,13 \pm 0,04$  cm, sedangkan *aquadest* sebagai kontrol menunjukkan nilai  $0,00 \pm 0,00$  cm. Perbedaan antara polifenol dan *aquadest* ditunjang melalui uji statistik *Tukey HSD* dimana didapatkan hasil 0,000 ( $p < 0,05$ ) yang membuktikan bahwa polifenol berbeda signifikan dibandingkan dengan *aquadest* dalam menghambat pertumbuhan *S. mutans*.

Perbandingan antara polifenol dengan konsentrasi yang berbeda menunjukkan beda yang signifikan, tetapi perbedaan 25% dianggap tidak memiliki beda yang signifikan. Polifenol dengan kadar 25% mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. mutan* sebesar  $0,87 \text{ cm} \pm 0,07$ . Polifenol dengan kadar 25% memiliki perbedaan yang signifikan jika diuji menggunakan uji *Tukey HSD* ( $p < 0,05$ ) dibandingkan dengan semua variabel, namun tidak signifikan jika dibandingkan dengan polifenol 50%. Polifenol 50% memberikan zona hambat  $0,91 \text{ cm} \pm 0,07$  dan memiliki perbedaan yang signifikan dibandingkan dengan semua variabel ( $p < 0,05$ )



menggunakan uji *Tukey HSD*, namun tidak signifikan jika dibandingkan dengan polifenol 25% dan 75%.

Polifenol 75% dan 100% memiliki kesimpulan yang sama dengan polifenol 25% dan 100%, yakni perbedaan kadar 25% tidak memberikan perbedaan yang signifikan dalam menghambat pertumbuhan *S. mutans*. Polifenol 75% memiliki perbedaan yang signifikan dibandingkan dengan semua variabel, kecuali dengan variabel polifenol 50% dan 100%. Polifenol 100% signifikan dibandingkan dengan semua variabel, kecuali dengan polifenol 75%.

Polifenol biji kakao jika dibandingkan dengan Eugenol, Cresophene, dan Chkm, masih kalah kuat dalam proses menghambat pertumbuhan bakteri *S. mutans*. Eugenol mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. mutans* dengan rata-rata zona hambat  $1,35 \text{ cm} \pm 0,06$ , lebih besar 0,22 jika dibandingkan dengan kemampuan polifenol 100% dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. mutans*. Cresophene memiliki rata-rata zona hambat  $2,03 \text{ cm} \pm 0,10$  dan Chkm memiliki rata-rata zona hambat  $2,07 \text{ cm} \pm 0,14$  yang hampir 2 kali lipat lebih kuat dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. mutans* jika dibandingkan dengan kemampuan polifenol 100% dalam proses antibakteri. Hal ini menunjukkan bahwa polifenol biji kakao mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. mutans*, namun kurang efektif jika dibandingkan dengan kemampuan Eugenol, Cresophene, dan Chkm dalam proses antibakteri, khususnya terhadap bakteri *S. mutans*. Kemampuan polifenol biji kakao mendekati kemampuan Eugenol dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. mutans*.

Data hasil analisis statistika menunjukkan bahwa pada tiap variabel dan kontrol terdapat perbedaan luas diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *S. mutans* yang signifikan. *Aquadest* sebagai kontrol memiliki nilai kemaknaan 0,000 ( $p < 0,05$ ) terhadap semua variabel pembanding. Hal ini menunjukkan *aquadest* memiliki perbedaan yang signifikan dibandingkan dengan semua variabel pembanding. Eugenol, Cresophene, dan Chkm juga memiliki nilai kemaknaan ( $p > 0,05$ ) yang signifikan dibandingkan dengan semua variabel, namun perbedaan yang tidak signifikan ditunjukkan oleh perbandingan Cresophene dan Chkm. Hal ini

menunjukkan bahwa kemampuan kedua obat ini (Cresophene dan Chkm) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. mutans* dianggap sama.

Sifat antibakteri polifenol didapat dari senyawa katekin dan proantosianidin yang terdapat dalam polifenol. Katekin adalah senyawa polifenol alami yang merupakan metabolit sekunder dan termasuk dalam penyusun golongan tanin, sedangkan proantosianidin adalah nama lain dari tanin yang terkondensasi (Lestari, 2009). Tanin mempunyai daya antibakteri dengan cara mempresipitasikan protein serta 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 dalam Grandiosa, 2010).

Selain katekin dan proantosianidin, sifat antibakteri polifenol juga didapat dari senyawa antosianin yang merupakan golongan pigmen yang disebut flavonoid (Wollgast dan Anklam, 2001). Özçelik *et al.* (2008) menyatakan bahwa tidak ada perbedaan daya antibakteri dari berbagai jenis flavonoid yang berasal dari sumber yang berbeda. Flavonoid merupakan golongan terbesar dari senyawa fenol dan memiliki mekanisme kerja dalam menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara menginaktivasi protein enzim pada membran sel sehingga mengakibatkan struktur protein menjadi rusak. Ketidakstabilan pada dinding sel dan membran sitoplasma bakteri akan mengakibatkan fungsi permeabilitas selektif, fungsi pengangkutan aktif, pengendalian susunan protein dari sel bakteri menjadi terganggu, sehingga akan menyebabkan hilangnya makromolekul dan ion dari sel, sehingga sel bakteri menjadi kehilangan bentuk dan selanjutnya akan terjadi lisis (Singh dalam Rinawati, 2010).

Proses antibakteri *S. mutans* dapat dibedakan menjadi 4, yaitu dengan penghambatan sintesis dinding bakteri, mengganggu permeabilitas membran bakteri, proses persaingan untuk mendapatkan makanan, mengganggu jalannya sintesis protein, dan penghambatan produksi asam nukleat (Brooks *et al.*, 2007).

Proses antibakteri yang pertama ialah dengan proses penghambatan sintesis dinding bakteri, sehingga *S. mutans* yang memiliki lapisan peptidoglikan yang relatif tebal (gram positif) akan lisis (Brooks *et al.*, 2007).

Proses antibakteri yang kedua ialah proses yang mengganggu permeabilitas bakteri. Permeabilitas membran sel bakteri yang terganggu akan dapat menyebabkan makromolekul dan ion akan terlepas dari bakteri sehingga bakteri akan mengalami kematian (Brooks *et al.*, 2007).

Proses antibakteri yang ketiga ialah dengan cara mengganggu jalannya sintesis protein yang berlangsung di dalam tubuh bakteri. Protein di dalam tubuh bakteri diperlukan untuk membentuk RNA yang berfungsi dalam metabolisme dan replikasi bakteri, sehingga sintesis protein yang terganggu akan mengakibatkan protein yang non fungsional, sehingga bakteri tidak dapat menjalankan proses metabolisme dan replikasi yang dapat menyebabkan kematian (Brooks *et al.*, 2007).

Proses antibakteri yang keempat ialah melalui penghambatan produksi asam nukleat. Asam nukleat ini diperlukan untuk replikasi bakteri, sehingga bakteri yang tidak mampu mensintesis asam nukleat akan mati (Brooks *et al.*, 2007).

Eugenol merupakan salah satu turunan dari senyawa fenol yang potensial memiliki daya antibakteri. Mekanisme antibakteri eugenol berkaitan dengan interaksi pada membran sel, dimana menyebabkan kehancuran membran sel (Anonim, 2011).

Klorofenol cair pada Chkm dianggap sebagai desinfektan yang kuat. Bila digunakan dalam saluran akar dapat menembus jauh ke dalam dentin yang sudah terinfeksi bakteri sebelumnya, tetapi juga ke foramen apikal dan ke jaringan periapikal. Pengaruh fenol pada Chkm terhadap antibakteri mungkin berdasarkan kemampuan lipid dalam menghancurkan bakteri untuk membran. Pada konsentrasi yang tinggi dapat mendenaturasi protein sel (Alinis, 2011).

Cresophene mempunyai fungsi sebagai bahan antibakterisida yang kuat. Sifat antibakterisida disebabkan adanya bahan antiseptik yang terkandung didalamnya, antara lain: parachlorophenol dengan kortikosteroid yang memiliki sedikit efek iritasi, dan deksametasone yang merupakan kortikosteroid efektif dengan lebih sedikit inflamasi dibandingkan dengan hidrokortison (Walton dan Torabinejad, 1998).

Efektifitas polifenol biji kakao dapat dilihat pada data hasil penelitian ini yang menunjukkan peningkatan dari polifenol dengan kadar 25%, 50%, 75%, hingga

100%. Polifenol dengan kadar 25% memiliki zona hambat terkecil, yakni  $0,87 \text{ cm} \pm 0,07$ . Polifenol 50% memiliki zona hambat yang lebih besar dibandingkan dengan polifenol dengan kadar 25%, yakni  $0,91 \text{ cm} \pm 0,07$ , namun tidak lebih besar dari polifenol dengan kadar 75% yang memiliki rata-rata zona hambat  $1,06 \text{ cm} \pm 0,07$ . Polifenol 100% memiliki rata-rata zona hambat yang paling besar, yaitu  $1,13 \text{ cm} \pm 0,04$ . Hal ini membuktikan bahwa semakin tinggi kadar polifenol, maka semakin efektif di dalam proses penghambatan pertumbuhan bakteri *S. mutans*. Namun perbedaan kadar 25% tidak memberikan efek yang cukup signifikan.

Hasil analisis statistik menggunakan uji beda *One Way ANOVA* menunjukkan tingkat kemaknaan yang cukup berarti yakni  $0,000$  ( $p < 0,05$ ). Analisis statistik dilanjutkan menggunakan *test uji Tukey HSD*, sehingga diketahui bahwa perbedaan yang signifikan yang diperoleh pada uji *One Way ANOVA* terdapat pada hampir semua perbandingan antar variable, perbedaan yang tidak signifikan didapatkan pada perbandingan obat Chkm dengan Cresophene, dan polifenol dengan perbedaan kadar sebesar 25%. Hal ini menunjukkan bahwa perbandingan kedua obat (Chkm dan Cresophene) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. mutans* dianggap sama dan kenaikan kadar polifenol sebanyak 25% tidak memberikan efek yang cukup signifikan terhadap pertumbuhan bakteri *S. mutans*.

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

### **5.1 Kesimpulan**

Kesimpulan dari penelitian ini adalah:

- a. Polifenol dengan kadar 100% mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. mutans* dengan lebih baik dibandingkan dengan polifenol konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%.
- b. Polifenol biji kakao dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. mutans* kurang efektif dibandingkan dengan Eugenol, Cresophene dan Chkm.

### **5.2 Saran**

- a. 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.
- b. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek-efek lain dari polifenol selain efek antibakteri yang telah terbukti dalam penelitian ini agar polifenol biji kakao lebih bermanfaat khususnya di bidang kesehatan.
- c. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan beberapa teknik ekstraksi polifenol pada biji kakao, sehingga diharapkan mendapat hasil ekstraksi yang jauh lebih efektif.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adamson, Lazarus, Mitchell, Prior, Cao, Jacobs, Kremers, Hammerstone, Rucker, Ritter, dan Schmitz. 1999. *HPLC Method for the Quantification of Procyanidins in Cocoa and Chocolate Samples and Correlation to Total Antioxidant Capacity*. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 47: 4184-4188.
- Alicia. 2010. *Licorice Root For Tooth Decay and Gum Disease – Benefit and Danger*. (on line). <http://aliciac.hubpages.com/hub/Licorice-Root-For-Tooth-Decay-and-Gum-Disease-Benefits-and-Dangers>. [29 Januari 2012].
- Alinis, A. A. 2011. *ChKM (Chlorophenol Kamfer Menthol)*. [online]. <http://anisadealinis.blogspot.com/2011/11/chkm-chlorphenol-kamfer-menthol.html>. [16 Februari 2012].
- Anonim, 2011. *Enterococcus faecalis* sebagai salah satu bakteri yang terdapat pada infeksi endodonti. [on line]. <http://repository.usu.ac.id/bitstream/123456789/21862/4/Chapter%20II.pdf>. [16 Februari 2012].
- Ansel, H.C. 1989. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Baba, Osakabe, Yasuda, Natsumi, Takizawa, Nakamura, dan Terao. 2000. *Bioavailability of (-)-Epicatechin Upon Intake of Chocolate and Cocoa in Human Volunteers*. Free Radical Research. 33: 635-641.
- Bachtiar, E. W. 1997. *Proses Vaksinasi dalam Pencegahan Karies dengan Antigen Hasil Rekayasa Protein Dinding Sel Streptococcus mutans*. Jurnal Kedokteran Gigi. Jakarta : Fakultas Kedokteran Gigi.
- Bonvehi, J. S., dan Coll, F. V. 2000. *Evaluation of Purine Alkaloids and Diketopiperazines Contents in Processed Cocoa Powder*. European Food Research and Technology. 210: 189-195.

- Brooks, G. F., Butel, J. S., dan Morse, S. A. 2007. *Mikrobiologi Kedokteran Jawetz, Melnick, and Adelberg*. 23th edition. Jakarta: EGC.
- Bulan, R. 2004. *Reaksi Asetilasi Eugenol dan Oksidasi Metil Iso Eugenol*. [on line]. <http://repository.usu.ac.id/bitstream/123456789/1856/1/kimia-rumondang.pdf>. Sumatra Utara: Program Studi Teknik Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sumatra Utara. [9 Februari 2012].
- Capuccino, James. G., Natalie, S. 2001. *Microbiology : A Laboratory Manual, Sixth Edition*. San Fransisico: Benjamin Cummings.
- Daniel, W. W. 2005. *Biostatistic a Foundation for Analysis in the Health Sciences*. 8th edition. Georgia: Wiley.
- Dewi, L. P. F. K. 2009. “Daya Antibakteri Ekstrak Minyak Jinten Hitam (*Nigella L.*) Terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans*”. Tidak Dipublikasikan. Skripsi. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Dreosti, I. E. 2000. *Antioxidant Polyphenols in Tea, Cocoa, and Wine*. Nutrition. 16: 692-694.
- Ed, dan F Man. 2004. *Cocoa Report Market*. 371. Ed dan F Man Ltd.
- Ganiswarna, S. G. 1995. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi ke 4. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- 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.
- Hammerstone, Lazarus, Mitchell, Rucker, dan Schmitz. 1999. *Identification of Procyanidins in Cocoa (*Theobroma Cacao*) and Chocolate Using High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 47: 490-496.
- Harmawan, S. 2010. “Pemanfaatan Ekstrak Polifenol Biji Kakao (*Theobroma cacao L.*) Kering Nonfermented Terserang *Conopormorpha cramerella* snellen dan *Phytophthora palmivora* butler Sebagai Antibakteri”. Tidak dipublikasikan.

Skripsi. Jember: Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

- Holt, Lazarus, Sullards, Zuu, Schramm, Hammerstone, Fraga, Schmitz, dan Keen. 2002. *Procyanidin Dimer B2 [Epicatechin-(4 $\beta$ -8)-epicatechin] in Human Plasma After the Consumption of a Flavanol-Rich Cocoa*. American Journal of Clinical and Nutrition. 76: 798-804.
- Inayati, U. 2008. "Uji Zona Hambat Ekstrak Bawang Putih (*Allium sativum* L.) Terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans*". Tidak Dipublikasikan. Skripsi. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Karim, M., McCormick, K., dan Kappagoda, C. T. 2000. *Effects of Cocoa Extract on Endothelium-Dependent Relaxation*. American Society for Nutritional Sciences. 2105s-2108s.
- Kattenberg, H.R. 2000. *Nutritional Functions of Cocoa and Chocolate*. The Manufacturing Confectioner. 33-37.
- Kim, H. dan Keeney, P.G. 1983. *Method of Analysis for (-)-Epicatechin in Cocoa Beans by High Performance Liquid Chromatography*. Journal of Food Science. 48: 548-551.
- Kim, H. dan Keeney, P.G. 1984. *(-)-Epicatechin Content in Fermented and Unfermented Cocoa Beans*. Journal of Food Science. 49: 1090-1092.
- Kunkel, D. 2004. *Microscopy of Streptococcus viridans*. (on line). <http://www.denniskunkel.com/DK/DK/Bacteria/97700A.html>. [17 Juli 2011].
- Lee, Kim, Lee, dan Lee. 2003. *Cocoa Has More Phenolic Phytochemical and a Higher Antioxidant Capacity Than Teas and Red Wine*. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 51: 7292-7295.
- 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. 16 (1): 8.
- Marsh, P. dan Martin, M. V. 1999. *Oral Microbiology*. 4th edition. Great Britain: MPG Books Ltd.



- Misnawi, Jinap, Jamilah, dan Nazamid. 2002a. *Oxidation of polyphenols in unfermented and partly fermented cocoa beans by cocoa polyphenol oxidase and tyrosinase*. Journal of the Science of Food and Agriculture. 82: 559-566.
- Misnawi, Jinap, Jamilah, dan Nazamid. 2002b. *Effects of incubation and polyphenol oxidase enrichment of unfermented and partly fermented dried cocoa beans on color, fermentation index and (-)-epicatechin content*. International Journal of Food Science and Technology. 38: 1-11.
- Misnawi, Jinap, Jamilah, dan Nazamid. 2003a. *Effects of Cocoa Liquor Roasting on Polyphenols Content, Their Hydrophobicity and Relation to Astringency*. ASEAN Food Journal. 12(2): 25-35.
- Misnawi, Jinap, Nafisyah, Norhamimah. 2003b. *Studies on The Polyphenol Extraction from Cocoa Beans*. Pelita Perkebunan. 19(3).
- Misnawi, Jinap, Jamilah, dan Nazamid. 2004a. *Effects of polyphenol on pyrazines formation during cocoa liquor roasting*. Food Chemistry. 85: 73-80.
- Misnawi, Jinap, Jamilah, dan Nazamid. 2004b. *Sensory properties of cocoa liquor as affected by polyphenol concentration and roasting duration*. Food quality and Preference. 15: 403-409.
- Misnawi, Jinap, Jamilah, dan Nazamid. 2004c. "Changes in polyphenol ability to produce astringency during roasting of cocoa liquor". Tidak Dipublikasikan. Makalah. Jember: Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia.
- Misnawi, Jinap, Jamilah, dan Nazamid. 2004d. *Polyphenol changes during fermentation and their impacts on astringency and bitterness of cocoa bean*. ASEAN Food Journal.
- Misnawi, Sumartono, Wahyudi, Ismayadi, Riyanto, dan Zakaria. 2008. "Aspek Kesehatan Biji Kakao dan Hasil-Hasil Penelitiannya (Health Aspects of Cocoa Beans and Recent Result of Research)". Tidak Dipublikasikan. Makalah. Jember: Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia.
- Notoatmodjo, S. 2003. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: Rineka Cipta.

- Nugraha, A.W. 2008. *Streptococcus mutans, Si Plak Dimana-mana*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma Yogyakarta.
- Ooshima, Osaka, Sasaki, Osawa, Yasuda, dan Matsumoto. 2000. *Cariostatic Activity of Cacao Mass Extract*. *Archives of Oral Biology*. 45: 805-808.
- Osakabe, Sanbongi, Yamagishi, dan Takizawa. 1998a. *Effects of Polyphenol Substances Derived from Theobroma Cacao on Gastric Mucosal Lesion Induced by Methanol*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 62: 1535-1538.
- Osakabe, Sanbongi, Yamagishi, Takizawa, Natsume dan Osawa. 1998b. *The Antioxidative Substances in Cacao Liquor*. *Journal of Nutrition Science and Vitaminology*. 44: 313-321.
- Osakabe, Yamagishi, Natsume, Takizawa, Nakamura, dan Osawa. 2000. *Antioxidative Polyphenolic Substances in Cacao Liquor*. In Parliament, T.H., Chi-tang Ho and Schieberle, P., *Caffeinated Beverages: Health Benefits, Physiological effects, and chemistry* (pp. 88-101), ACS Symposium Series 754.
- Özçelik, Orhan, Özgen, dan Ergun. 2008. *Antimicrobial Activity of Flavonoids against Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ES $\beta$ L)-Producing Klebsiella pneumoniae*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 7 (4): 1151-1157.
- Pearson, Paglieroni, Rein, Wun, Schramm, Wang, Holt, Gosselin, Schimts, dan Keen. 2002. *The Effects of Flavonol-Rich Cocoa and Aspirin on Ex Vivo Platelet Function*. *Thrombosis Research*. 105: 191-197.
- Penny, M. K., dan Keen, C. L. 2002. *Evidence That The Antioxidant Flavonoids in Tea and Cocoa are Beneficial for Cardiovascular Health*. *Nutrition and Metabolism*. 13: 41-49.
- Porter, L. J., Ma, Z., dan Chan, G. 1991. *Cacao Procyanidins: Major Flavonoids and Identification of Some Minor Metabolites*. *Phytochemistry*. 30: 1657-1663.
- Pratama, A. 2011. *Perawatan Saluran Akar*. [on line]. <http://www.adifkgugm.com/>. [9 Februari 2012].
- Pratama, M. R. 2005. "Pengaruh Ekstrak Serbuk Kayu Siwak (*Salvadora persica*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus mutans* dan *Streptococcus aureus*

- Dengan Metode Difusi Agar”. Tidak Dipublikasikan. Skripsi. Surabaya: Program Study biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Teknologi Sepuluh November.
- Prayoga, R. D. 2010. “Pemanfaatan Biji Kakao Untuk Produksi Polifenol Sebagai Senyawa Antibakteri”. Tidak Dipublikasikan. Skripsi. Jember: Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknik Pertanian Universitas Jember.
- Rigaud, Escribano-mailon, Prieur, Souquet, dan Cheynier. 1993. *Normal-Phase High-Performance Liquid Chromatographic Separation of Procyanidins from Cacao and Grape Seeds*. Journal of Chromatography A. 654: 255-260.
- Rinawati, N. D. 2010. *Daya Antibakteri Tumbuhan Majapahit (Crescentia cujete L.) terhadap Bakteri Vibrio alginolyticus*. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh November.
- Samarayanake, L. P. 2002. *Essential Mikrobiologi for Dentistry second edition*. Philadelphia, United States of America: Elsevier’s Health Sciences Rights Departement.
- Sanbongi, Osakabe, Natsume, Takizawa, Gomi, dan Osawa. 1998. *Antioxidative Polyphenols Isolated from Theobroma Cacao*. Journal of Agricultural Food Chemistry. 46: 452-457.
- Setiadevi, S. 2010. “Karakterisasi Ekstrak Polifenol Biji Kakao Nonfermented dari Berbagai Macam Metode Ekstraksi”. Tidak Dipublikasikan. Skripsi. Jember: Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.
- Steinberg, Holt, Schmits, dan Keen. 2002. *Cocoa Procyanidin Chain Length Does Not Determine Ability to Protect LDL From Oxidation When Monomer Units are Controlled*. Journal of Nutritional Biochemistry. 13: 645-652.
- Sukanto , S. P., dan Yulianti, A. 2002. *Daya Hambat Ekstrak Kulit Buah Delima Putih Terhadap Pertumbuhan Streptococcus mutans*. Majalah kedokteran gigi (Dent.J). 35 (3): 95-98.
- Sunanto, H. 1992. *Cokelat Pengolahan Hasil dan Aspek Ekonominya*. Yogyakarta: Kanisius.

- Suryani, M. I. 2010. *Pembuatan Cokelat*. [on line]. <http://whitewishes.wordpress.com/2010/02/12/pembuatan-cokelat/>. [30 September 2011].
- Walton, R. E., dan Torabinejad, M. 1998. *Prinsip dan Praktik Ilmu Endodonsia*. Edisi ketiga. Jakarta: EGC.
- Woollgast, Pallaroni, Agazzi, dan Anklam. 2001. *Analysis of Procyanidins in Chocolate by Reserved-Phase High Performance Liquid Chromatography With Electrospray Ionization Mass Spectrometric and Tandem Mass Spectrophotometric Detection*. *Journal of Chromatography A*. 926: 211-220.
- Zeuthen, P., dan Sorensen, B. L. B. 2003. *Food Preservation Techniques*. London: Woodhead Publishing.

### Lampiran A. Perhitungan Besar Sampel Penelitian

Rumus perhitungan besar sampel penelitian menurut Daniel adalah sebagai berikut:

$$n = \frac{Z^2 \sigma^2}{d^2}$$

Keterangan:

n = besar sampel minimal

$Z^2$  = nilai Z pada tingkat kesalahan tertentu ( $\alpha$ ); jika  $\alpha = 0,05$ , maka nilai Z adalah  $Z = 1,96$  (2-tailed) dan  $Z = 1,64$  (1-tailed)

$\sigma^2$  = standard deviasi pada penelitian sejenis

d = kesalahan yang masih dapat ditoleransi

$\alpha$  = derajat signifikansi (0,05)

P = keterpercayaan penelitian (80%)

Pada penelitian ini nilai  $\sigma$  diasumsikan sama dengan nilai d ( $\sigma = d$ ), hal ini dikarenakan bahwa nilai  $\sigma^2$  jarang sekali diketahui sehingga harus menduganya. Masalah ini dapat dihilangkan dengan mendefinisikan d diucapkan dalam  $\sigma$  (Steel dan Torrie, 1995). Maka hasil penghitungan besar sampel adalah sebagai berikut :

$$n = \frac{Z^2 \sigma^2}{d^2}$$

$$n = \frac{(1,96)^2 \cancel{\sigma^2}}{\cancel{d^2}}$$

$$n = (1,96)^2$$

$$n = 3,84 = 4$$

Dari hasil perhitungan menggunakan rumus diatas, diperoleh jumlah sampel minimal adalah 4 (Daniel, 2005).

**Lampiran B. Foto Alat Penelitian**

A. Autoclave; B. Desicator; C. Incubator; D. Spektrofotometer

Gambar B.1 Foto alat penelitian



A. Erlenmeyer; B. Cakram kertas filter; C. Caliper

Gambar B.2 Foto alat penelitian

### Lampiran C. Foto Bahan Penelitian



A. Bubuk BHI-A; B. Bubuk BHI-B; C. Suspensi *S. mutans*

Gambar C.1 Foto bahan penelitian



A. Polifenol biji kakao; B. Cresophene; C. Chkm; D. Eugenol; E. Aquadest

Gambar C.2 Foto bahan penelitian



### Lampiran D. Data Hasil Penelitian Dengan 3 kali pengukuran

Data hasil pengukuran zona hambat pengukuran pertama

Bahan	Penelitian 1 (cm)	Penelitian 2 (cm)	Penelitian 3 (cm)	Penelitian 4 (cm)
<i>Aquadest</i>	0,00	0,00	0,00	0,00
Polifenol 25%	0,80	0,80	0,90	0,95
Polifenol 50%	0,95	0,90	1,00	0,85
Polifenol 75%	1,15	1,00	1,05	1
Polifenol 100%	1,10	1,15	1,15	1,10
Chkm	1,90	2,25	2,05	2,05
Cresophene	1,90	2,10	2,00	2,00
Eugenol	1,30	1,25	1,40	1,40

Data hasil pengukuran zona hambat pengukuran kedua

Bahan	Penelitian 1 (cm)	Penelitian 2 (cm)	Penelitian 3 (cm)	Penelitian 4 (cm)
<i>Aquadest</i>	0,00	0,00	0,00	0,00
Polifenol 25%	0,85	0,85	0,79	0,97
Polifenol 50%	0,90	0,84	1,07	0,87
Polifenol 75%	1,10	1,30	0,97	1,03
Polifenol 100%	1,10	1,13	1,15	1,08
Chkm	1,90	2,25	2,02	2,04
Cresophene	1,90	2,15	2,05	2,02
Eugenol	1,30	1,35	1,42	1,35

Data hasil pengukuran zona hambat pengukuran ketiga

Bahan	Penelitian 1 (cm)	Penelitian 2 (cm)	Penelitian 3 (cm)	Penelitian 4 (cm)
<i>Aquadest</i>	0,00	0,00	0,00	0,00
Polifenol 25%	0,84	0,83	0,87	0,98
Polifenol 50%	0,85	0,83	0,97	0,84
Polifenol 75%	1,14	1,07	0,97	0,96
Polifenol 100%	1,14	1,10	1,23	1,06
Chkm	1,94	2,28	2,07	2,04
Cresophene	1,90	2,20	2,02	2,08
Eugenol	1,34	1,27	1,43	1,36

## Rata-rata hasil pengukuran zona hambat

Bahan	Penelitian 1 (cm)	Penelitian 2 (cm)	Penelitian 3 (cm)	Penelitian 4 (cm)	Rata-Rata (cm)
<i>Aquadest</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Polifenol 25%	0,83	0,83	0,85	0,97	0,87
Polifenol 50%	0,90	0,86	1,01	0,85	0,91
Polifenol 75%	1,13	1,12	1,00	1,00	1,06
Polifenol 100%	1,11	1,13	1,18	1,08	1,13
Chkm	1,91	2,26	2,05	2,04	2,07
Cresophene	1,90	2,15	2,02	2,03	2,03
Eugenol	1,31	1,29	1,42	1,37	1,35

## Lampiran E. Analisis Data Penelitian

### E.1 Deskriptif Data Penelitian

#### Descriptives

Zona Hambat

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Aquadest	4	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
Polifenol 25%	4	.8700	.06733	.03367	.7629	.9771	.83	.97
Polifenol 50%	4	.9050	.07326	.03663	.7884	1.0216	.85	1.01
Polifenol 75%	4	1.0625	.07228	.03614	.9475	1.1775	1.00	1.13
Polifenol 100%	4	1.1250	.04203	.02102	1.0581	1.1919	1.08	1.18
Chkm	4	2.0650	.14480	.07240	1.8346	2.2954	1.91	2.26
Cresophene	4	2.0250	.10214	.05107	1.8625	2.1875	1.90	2.15
Eugenol	4	1.3475	.05909	.02955	1.2535	1.4415	1.29	1.42
Total	32	1.1750	.63702	.11261	.9453	1.4047	.00	2.26

### E.2 Uji Normalitas

#### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Zona Hambat
N		32
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	1.1750
	Std. Deviation	.63702
Most Extreme Differences	Absolute	.169
	Positive	.122
	Negative	-.169
Kolmogorov-Smirnov Z		.956
Asymp. Sig. (2-tailed)		.320

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

### E.3 Uji Homogenitas

#### Test of Homogeneity of Variances

Zona Hambat

Levene Statistic	df 1	df 2	Sig.
1.487	7	24	.219

#### E.4 Uji ANOVA Satu Arah (*One Way ANOVA*)

##### ANOVA

Zona Hambat

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	12.424	7	1.775	274.203	.000
Within Groups	.155	24	.006		
Total	12.580	31			

#### E.5 Uji Tukey HSD

##### Zona Hambat

Tukey HSD<sup>a</sup>

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05					
		1	2	3	4	5	6
Aquadest	4	.0000					
Polifenol 25%	4		.8700				
Polifenol 50%	4		.9050	.9050			
Polifenol 75%	4			1.0625	1.0625		
Polifenol 100%	4				1.1250		
Eugenol	4					1.3475	
Cresophene	4						2.0250
Chkm	4						2.0650
Sig.		1.000	.998	.150	.951	1.000	.996

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: Zona Hambat

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Aquadest	Polifenol 25%	-.87000*	.05689	.000	-1.0584	-.6816
	Polifenol 50%	-.90500*	.05689	.000	-1.0934	-.7166
	Polifenol 75%	-1.06250*	.05689	.000	-1.2509	-.8741
	Polifenol 100%	-1.12500*	.05689	.000	-1.3134	-.9366
	Chkm	-2.06500*	.05689	.000	-2.2534	-1.8766
	Cresophene	-2.02500*	.05689	.000	-2.2134	-1.8366
	Eugenol	-1.34750*	.05689	.000	-1.5359	-1.1591
Polifenol 25%	Aquadest	.87000*	.05689	.000	.6816	1.0584
	Polifenol 50%	-.03500	.05689	.998	-.2234	.1534
	Polifenol 75%	-.19250*	.05689	.043	-.3809	-.0041
	Polifenol 100%	-.25500*	.05689	.003	-.4434	-.0666
	Chkm	-1.19500*	.05689	.000	-1.3834	-1.0066
	Cresophene	-1.15500*	.05689	.000	-1.3434	-.9666
	Eugenol	-.47750*	.05689	.000	-.6659	-.2891
Polifenol 50%	Aquadest	.90500*	.05689	.000	.7166	1.0934
	Polifenol 25%	.03500	.05689	.998	-.1534	.2234
	Polifenol 75%	-.15750	.05689	.150	-.3459	.0309
	Polifenol 100%	-.22000*	.05689	.014	-.4084	-.0316
	Chkm	-1.16000*	.05689	.000	-1.3484	-.9716
	Cresophene	-1.12000*	.05689	.000	-1.3084	-.9316
	Eugenol	-.44250*	.05689	.000	-.6309	-.2541
Polifenol 75%	Aquadest	1.06250*	.05689	.000	.8741	1.2509
	Polifenol 25%	.19250*	.05689	.043	.0041	.3809
	Polifenol 50%	.15750	.05689	.150	-.0309	.3459
	Polifenol 100%	-.06250	.05689	.951	-.2509	.1259
	Chkm	-1.00250*	.05689	.000	-1.1909	-.8141
	Cresophene	-.96250*	.05689	.000	-1.1509	-.7741
	Eugenol	-.28500*	.05689	.001	-.4734	-.0966
Polifenol 100%	Aquadest	1.12500*	.05689	.000	.9366	1.3134
	Polifenol 25%	.25500*	.05689	.003	.0666	.4434
	Polifenol 50%	.22000*	.05689	.014	.0316	.4084
	Polifenol 75%	.06250	.05689	.951	-.1259	.2509
	Chkm	-.94000*	.05689	.000	-1.1284	-.7516
	Cresophene	-.90000*	.05689	.000	-1.0884	-.7116
	Eugenol	-.22250*	.05689	.013	-.4109	-.0341
Chkm	Aquadest	2.06500*	.05689	.000	1.8766	2.2534
	Polifenol 25%	1.19500*	.05689	.000	1.0066	1.3834
	Polifenol 50%	1.16000*	.05689	.000	.9716	1.3484
	Polifenol 75%	1.00250*	.05689	.000	.8141	1.1909
	Polifenol 100%	.94000*	.05689	.000	.7516	1.1284
	Cresophene	.04000	.05689	.996	-.1484	.2284
	Eugenol	.71750*	.05689	.000	.5291	.9059
Cresophene	Aquadest	2.02500*	.05689	.000	1.8366	2.2134
	Polifenol 25%	1.15500*	.05689	.000	.9666	1.3434
	Polifenol 50%	1.12000*	.05689	.000	.9316	1.3084
	Polifenol 75%	.96250*	.05689	.000	.7741	1.1509
	Polifenol 100%	.90000*	.05689	.000	.7116	1.0884
	Chkm	-.04000	.05689	.996	-.2284	.1484
	Eugenol	.67750*	.05689	.000	.4891	.8659
Eugenol	Aquadest	1.34750*	.05689	.000	1.1591	1.5359
	Polifenol 25%	.47750*	.05689	.000	.2891	.6659
	Polifenol 50%	.44250*	.05689	.000	.2541	.6309
	Polifenol 75%	.28500*	.05689	.001	.0966	.4734
	Polifenol 100%	.22250*	.05689	.013	.0341	.4109
	Chkm	-.71750*	.05689	.000	-.9059	-.5291
	Cresophene	-.67750*	.05689	.000	-.8659	-.4891

\*. The mean difference is significant at the .05 level.