



**DAYA ADHESI *Streptococcus mutans* PADA NETROFIL
YANG DIINKUBASI EKSTRAK POLIFENOL BIJI
KAKAO (*Theobroma cacao L*)**

SKRIPSI

Oleh:
**NOVEMA YOLANDA INTAN RAKHMAWATI
NIM 081610101095**

**BAGIAN BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2012**



**DAYA ADHESI *Streptococcus mutans* PADA NETROFIL
YANG DIINKUBASI EKSTRAK POLIFENOL BIJI
KAKAO (*Theobroma cacao L*)**

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:

**NOVEMA YOLANDA INTAN RAKHMAWATI
NIM 081610101095**

**BAGIAN BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2012**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini kupersembahkan untuk :

1. Allah SWT dan Nabi Muhammad SAW
2. Both of my parents, ayah Alm Solich Effendi dan ibu Ninik Kuswati yang telah membesarkanku, mengisi waktu-waktu dengan warna dan hangatnya keluarga. Mengajarkanku segala hal yang mampu membuatku bertahan dalam hidup. Mendengarkan setiap keluhan dan tangisan, mampu memberikan motivasi dan dukungan hingga sampai sejauh ini. Yang tanpa lelah selalu memberikan doa dan senyum kepada saya.
3. Kakak dan adekku Fenny Shera Luckyartha dan Diandra Ariesta Lily E.A yang selalu memotivasiku untuk mewujudkan mimpi-mimpi dan memberikan makna persaudaraan yang begitu berarti.
4. Almamaterku tercinta

MOTTO

“Orang yang luar biasa itu sederhana dalam ucapan, tetapi hebat dalam tindakan,” (Confusius).

PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Novema Yolanda Intan Rakhmawati

NIM : 081610101095

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis ilmiah yang berjudul “Daya Adhesi *Streptococcus Mutans* Pada Netrofil Yang Diinkubasi Ekstrak Polifenol Biji Kakao (*Theobroma cacao L*)” adalah benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan diinstitusi 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,

Novema Yolanda Intan Rakhmawati

NIM 081610101095

SKRIPSI

**DAYA ADHESI *Streptococcus mutans* PADA NETROFIL
YANG DIINKUBASI EKSTRAK POLIFENOL BIJI
KAKAO (*Theobroma cacao L*)**

Oleh:

Novema Yolanda Intan Rakhmawati
NIM 081610101095

Pembimbing

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

Dosen Pembimbing Anggota : drg. Desi Sandra Sari, M. DSc

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Daya Adhesi *Streptococcus Mutans* Pada Netrofil Yang Diinkubasi Ekstrak Polifenol Biji Kakao (*Theobroma cacao L*)” 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

Anggota II

drg. Desi Sandra Sari, M. DSc
NIP 197512152003122005

Dr. drg. I Dewa Ayu Susilawati, M.Kes
NIP 196109031986022001

Mengesahkan
Dekan Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Jember,

drg. Hj. Herniyati, M.Kes
NIP 195909061985032001

RINGKASAN

Daya Adhesi *Streptococcus Mutans* Pada Netrofil Yang Diinkubasi Ekstrak Polifenol Biji Kakao (*Theobroma cacao L*); Novema Yolanda Intan Rakhmawati, 081610101095; 2012: 45 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Biji tanaman kakao mengandung polifenol sebagai bahan bioaktif yang berfungsi sebagai antiinflamasi. Polifenol sebagai antiinflamasi mampu menghambat adhesi bakteri dan sel netrofil saat mengadakan perlekatan pada interaksi hidrofobik dengan menurunkan hidrofobisitas reseptor pada membran sel karena sifat polifenol yang hidrofilik. Sel netrofil merupakan pertahanan tubuh non spesifik yang pertama kali mengatasi adanya antigen diawali dengan perlekatan dan selanjutnya memfagosit antigen tersebut. Sel netrofil hanya mampu memfagositosis bakteri 3-20 kemudian akan lisis dan terjadi pengeluaran cairan intraseluler termasuk enzim lisosom sehingga menyebabkan kerusakan pada jaringan normal sekitarnya. Bakteri *S. mutans* merupakan bakteri utama penyebab karies yang mendemineralisasi email gigi hasil fermentasi asam dan selanjutnya akan menginvasi dentin dan menyebabkan inflamasi pulpa (pulpitis) pada kondisi lanjut. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui polifenol ekstrak biji kakao mampu sebagai antiinflamasi dengan menurunkan kemampuan adhesi bakteri *S. mutans* pada sel netrofil.

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental labolatoris *in vitro* dengan rancangan penelitian dengan kelompok kontrol (*The Post Test Only Control Group Design*). Pada penelitian ini digunakan ekstrak polifenol biji kakao konsentrasi 50% dan 100% dibandingkan dengan kelompok kontrol. Penelitian ini dilakukan dalam empat tahapan, tahapan pertama preparasi polifenol biji kakao untuk mendapatkan konsetrat polifenol biji kakao. Tahapan kedua yaitu isolasi netrofil yaitu untuk mendapatkan sel netrofil yang terpisah dari sel-sel darah lain. Tahapan ketiga yaitu preparasi *S. mutans* dan tahapan terakhir yaitu perlakuan uji indeks adhesi *S. mutans* pada netrofil yang diinkubasi ekstrak polifenol biji kakao. Kemudian dilakukan penghitungan dengan mengambil 100 sel netrofil pada tiap kelompok sampel dan

dihitung berapa *S. mutans* yang melekat pada satu sel netrofil. Kemudian dilakukan analisis statistik parametrik menggunakan uji *one way ANOVA*, didapatkan hasil variabel-variabel yang diuji memiliki perbedaan yang bermakna. Dilanjutkan dengan uji LSD untuk mengetahui perbedaan variabel antar kelompok perlakuan dan didapatkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna pada variabel yang diuji.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa adhesi *S. mutans* dengan netrofil pada kelompok kontrol memiliki rata-rata paling tinggi dibandingkan dengan kelompok yang diberikan ekstrak polifenol biji kakao. Pada kelompok yang diberikan ekstrak polifenol biji kakao konsentrasi 100% memiliki keefektifan paling tinggi untuk menurunkan adhesi *S. mutans* pada netrofil dibandingkan dengan polifenol 50%.

Polifenol ekstrak biji kakao memiliki pengaruh dalam menurunkan daya adhesi *S. mutans* pada sel netrofil. Sel netrofil mengadakan perlekatan dengan *S. mutans* melalui interaksi hidrofobik, karena sifat polifenol yang hidrofilik maka polifenol mampu menurunkan hidrofobisitas membran sel sehingga menghambat perlekatan. Sel netrofil mampu memfagosit 3-20 bakteri kemudian akan lisis dan terjadi pengeluaran cairan intraselular termasuk enzim lisosim sebagai enzim pencernaan akan merusak jaringan normal disekitarnya. Penurunan adhesi *S. mutans* pada netrofil, menurunkan jumlah sel netrofil yang lisis sehingga mampu mengurangi terjadinya perusakan jaringan akibat enzim lisosim yang mencerna jaringan normal.

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan maka dapat ditarik kesimpulan polifenol ekstrak biji kakao berpengaruh menurunkan daya adhesi *S. mutans* pada sel netrofil dengan konsentrasi 100% lebih efektif dibandingkan dengan 50%.

PRAKATA

Tiada kata yang pantas terucap kecuali rasa syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan anugerah dan hikmatNya, sehingga skripsi yang berjudul “Daya Adhesi *Streptococcus Mutans* Pada Netrofil Yang Diinkubasi Ekstrak Polifenol Biji Kakao (*Theobroma cacao L*)” dapat terselesaikan. 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. Desi Sandra Sari, M. DSc selaku Dosen Pembimbing Anggota, yang selalu membimbing, memberikan petunjuk dan memotivasi dalam penulisan skripsi ini.
3. Dr. drg. I Dewa Ayu Susilawati, M.Kes selaku dosen yang telah banyak membantu dan membimbing dalam pelaksanaan penelitian dalam skripsi ini dan sekaligus sebagai sekretaris penguji yang telah memberikan banyak masukan demi kesempurnaan skripsi ini.
4. drg. M. Nurul Amin, M.Kes selaku PJMK Biologi Kedokteran yang selalu membantu dan memotivasi dalam penyelesaian skripsi ini.
5. drg. Hestieyonini Hadnyanawati, M.Kes selaku dosen wali yang selalu memberikan banyak motivasi untuk terus mengejar prestasi.
6. Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia yang telah memberikan bahan dalam kelancaran penelitian ini.
7. Ibu, terima kasih atas segala pengorbanan, cinta kasih, dorongan semangat, nasehat, tempat mengeluh dan menangis serta doa yang tidak pernah berhenti.
8. Ayah, terima kasih atas waktu-waktu terindah 17 tahun bersama motivasi utama menjadi dokter dan menjadi orang yang lebih baik.

9. Kakakku Fenny Shera Luckyartha beserta suami Aprian Tiastono, terima kasih telah memberi arti persaudaraan yang indah dalam hari-hari dan selalu memotivasi dan memberi dukungan dalam hidup.
10. Adikku Diandra Ariesta Lily Effendi Al.Azhim, terima kasih telah memberi arti persaudaraan yang indah dan selalu saling berbagi dan menguatkan saat kesusahan.
11. Kiki Adrianto, terima kasih telah mengisi waktu-waktu yang paling berharga dalam hidup, memotivasi dan membantu hingga terselesaikannya skripsi ini.
12. Sahabat-sahabatku, Mita, Febi, Yulia, Tasya, Bondan dan sahabat di Malang yang selalu mengerti dan ada disaat-saat sedih dan senang.
13. Teman-teman angkatan FKG 2008, bersyukur berada di angkatan ini
14. Tim skripsi Biodok Kiki, Nizar, Rere, Icha, Ais dan Lila terima kasih atas motivasi, bantuan dan dukungannya.
15. Keluarga Kiki Adrianto, terima kasih banyak untuk semua.
16. Teman-teman KKT yang begitu mengesankan 45 hari bersama Ratih, Rere, Lila, Ayung, Arum, Laura, Wiwik, Fuad, Mando, Jefri, Farid.
17. Semua pihak yang membantu hingga terselesaikannya skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu.

Jember, Februari 2012

Penulis

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|---------------------------------------|---------|
| HALAMAN JUDUL | i |
| HALAMAN PERSEMBAHAN | ii |
| HALAMAN MOTO | iii |
| HALAMAN PERNYATAAN | iv |
| HALAMAN PEMBIMBINGAN | v |
| HALAMAN PENGESAHAN | vi |
| RINGKASAN | vii |
| PRAKATA | ix |
| DAFTAR ISI | xi |
| DAFTAR TABEL | xiv |
| DAFTAR GAMBAR | xv |
| DAFTAR LAMPIRAN | xvii |
| BAB 1. PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah | 3 |
| 1.3 Tujuan Penelitian | 3 |
| 1.4 Manfaat Penelitian | 3 |
| BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA | 4 |
| 2.1 Kakao | 4 |
| 2.1.1 Klasifikasi | 4 |
| 2.1.2 Morfologi Kakao | 5 |
| 2.1.3 Habitat Kakao..... | 5 |
| 2.1.4 Kandungan Kimia Biji Kakao..... | 6 |
| 2.1.5 Polifenol Biji Kakako | 6 |
| 2.2 Inflamasi | 8 |

| | |
|---|-----------|
| 2.3 Manfaat Biji Kakao Sebagai Antiinflamasi | 9 |
| 2.4 Netrofil | 11 |
| 2.4.1 Morfologi Sel Netrofil | 12 |
| 2.4.2 Membran Sel Netrofil | 13 |
| 2.4.3 Sifat-Sifat Sel Netrofil | 14 |
| 2.4.4 Mekanisme Sel Netrofil Dalam Pertahanan Tubuh | 15 |
| 2.5 <i>Streptococcus mutans</i> | 17 |
| 2.5.1 Taksonomi <i>S.mutans</i> | 17 |
| 2.5.2 Morfologi dan Habitat <i>S.mutans</i> | 18 |
| 2.5.3 Patogenesis <i>S.mutans</i> | 19 |
| 2.5.4 Mekanisme Perlekatan Dinding Sel Bakteri Dengan Sel Inang | 19 |
| 2.6 Indeks Adhesi | 20 |
| 2.7 Hipotesis | 21 |
| BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN | 22 |
| 3.1 Jenis Penelitian..... | 22 |
| 3.2 Waktu dan Tempat Penelitian..... | 22 |
| 3.2.1 Waktu Penelitian..... | 22 |
| 3.2.2 Tempat Penelitian | 22 |
| 3.3 Identifikasi Variabel..... | 22 |
| 3.3.1 Variabel Bebas..... | 22 |
| 3.3.2 Variabel Terikat | 22 |
| 3.3.3 Variabel Terkendali | 23 |
| 3.4 Sampel..... | 23 |
| 3.5 Definisi Operasional | 23 |
| 3.5.1 Ekstrak Polifenol Biji Kakao | 23 |
| 3.5.2 Netrofil..... | 23 |
| 3.5.3 <i>Streptococcus mutans</i> | 23 |
| 3.5.4 Indeks Adhesi..... | 24 |
| 3.6 Alat dan Bahan | 24 |

| | |
|---|-----------|
| 3.6.1 Alat..... | 24 |
| 3.6.2 Bahan | 24 |
| 3.7 Prosedur Penelitian | 24 |
| 3.7.1 Preparasi Polifenol Biji Kakao (<i>Theobroma cacao L.</i>)..... | 24 |
| 3.7.2 Isolasi Netrofil | 25 |
| 3.7.3 Preparasi <i>s.mutans</i> | 26 |
| 3.7.4 Indeks Adhesi..... | 27 |
| 3.8 Analisis Data | 28 |
| 3.9 Alur Penelitian | 29 |
| BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN | 30 |
| 4.1 Hasil Penelitian | 30 |
| 4.1.1 Data Penelitian..... | 30 |
| 4.1.2 Analisis Data..... | 34 |
| 4.2 Pembahasan | 36 |
| BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN..... | 40 |
| 5.1 Kesimpulan..... | 40 |
| 5.2 Saran..... | 40 |
| DAFTAR PUSTAKA | 41 |
| LAMPIRAN..... | 46 |

DAFTAR TABEL

| | Halaman |
|---|---------|
| 2.1 Kandungan total polifenol produk kakao | 6 |
| 2.2 Persentase tipe dari sel darah putih | 12 |
| 4.1 Rata-rata hasil penghitungan indeks adhesi <i>S. mutans</i> pada sel netrofil yang diinkubasi ekstrak polifenol biji kakao | 32 |
| 4.2 Perbandingan adhesi <i>S.mutans</i> pada netrofil antara masing-masing kelompok | 35 |

DAFTAR GAMBAR

| | Halaman |
|--|---------|
| 2.1 Pohon dan buah kakao | 5 |
| 2.2 Pembagian kelas polifenol | 7 |
| 2.3 Gambaran mikroskopis netrofil..... | 13 |
| 2.4 <i>Attachment</i> (adhesi), fagositosis dan pembunuhan bakteri intraseluler | 14 |
| 2.5 Opsonisasi | 16 |
| 2.6 Perlekatan antigen bakteri, komplemen C3b dan sel fagosit | 17 |
| 2.7 Gambaran mikroskopis koloni <i>S. mutans</i> pada epitel | 18 |
| 2.8 Struktur membran..... | 21 |
| 4.1 Preparat hasil isolasi netrofil. Menunjukkan netrofil yang berwarna pink keunguan (Pengecatan Giemza, pembesaran 1000x), tampak bentukan polimorfonuklear, yaitu nukleus yang memiliki lobus-lobus (tanda panah), terdiri dari 3-5 lobus..... | 30 |
| 4.2 Sediaan <i>S.mutans</i> terlihat berwarna ungu pada pemeriksaan mikroskopik sesuai sifat bakteri, gram positif berbentuk bulat membentuk pasangan atau rantai(Pengecatan Gram,pembesaran 1000x). | 31 |
| 4.3 Gambaran mikroskopis sel netrofil yang viabel setelah diberi ekstrak polifenol biji kakao pembesaran 400x | 31 |
| 4.4 Histogram rata-rata adhesi <i>S. mutans</i> pada sel netrofil yang diinkubasi ekstrak polifenol biji kakao pada tiap kelompok | 33 |
| 4.5 Gambaran mikroskopis adhesi <i>S. mutans</i> pada sel netrofil yang diberikan RPMI (kelompok kontrol) menunjukkan adhesi <i>S.mutans</i> (tanda panah) dalam jumlah 7-12 bakteri/sel, banyaknya <i>S.mutans</i> melekat menyebabkan netrofil lisis dan membran sel pecah terjadi pengeluaran cairan intraseluler (Pengecatan Giemza, pembesaran 1000x) | 33 |
| 4.6 Gambaran mikroskopis adhesi <i>S. mutans</i> pada sel netrofil yang diinkuba | |

si ekstrak polifenol 50% adhesi *S. mutans* (tanda panah) sedikit dengan rata-rata 4-7 bakteri/sel (Pengecatan Giemza, pembesaran 1000x)..... 34

4.7 Gambaran mikroskopis adhesi *S. mutans* pada sel netrofil yang diinkubasi ekstrak polifenol 100% tampak adhesi *S. mutans* (tanda panah) dengan rata-rata 2-5 bakteri/sel (Pengecatan Giemza, pembesaran 1000x) 34

DAFTAR LAMPIRAN

| | Halaman |
|--------------------------------|----------------|
| A. Surat Ijin Penelitian..... | 46 |
| B. Data Hasil Penelitian..... | 47 |
| C. Analisis Data | 50 |
| D. Foto alat penelitian..... | 52 |
| E. Foto bahan penelitian | 55 |

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tanaman kakao memiliki banyak manfaat pada bidang kesehatan. Pada seluruh bagian dari tanaman kakao dapat dimanfaatkan, tak terkecuali pada biji kakao (Ed dan F. Man, 2004). Pada penelitian Misnawi (2002), bubuk biji kakao bebas lemak memiliki kandungan polifenol sebanyak 5-18% yang memiliki manfaat di bidang kesehatan. Polifenol merupakan senyawa fenol yang terdiri dari asam fenolat dan flavonoid yang memiliki efek antiinflamasi (Daniswara, 2008). Polifenol bersifat hidrofilik dan berperan sebagai antiinflamasi dengan menghambat adhesi bakteri dan sel saat mengadakan perlekatan pada interaksi hidrofobik. Polifenol mampu menurunkan hidrofobisitas reseptor pada membran sel, sehingga dapat menghambat perlekatan (Hamsari, 2010).

Inflamasi merupakan respon terhadap cedera jaringan dan infeksi di dalam tubuh. Ketika proses inflamasi berlangsung, akan terjadi suatu reaksi vaskular dimana cairan, elemen-elemen darah, sel darah putih dan mediator kimia akan berkumpul pada tempat terjadinya cedera jaringan atau infeksi (Kee dan Hayes, 1996). Sel-sel darah putih yang tertimbun, terutama netrofil dan monosit pada lokasi terjadinya jejas, merupakan aspek terpenting reaksi radang (Robins dan Kumar, 1995).

Netrofil merupakan sel pertahanan tubuh non spesifik pertama kali mengatasi adanya antigen yang diawali dengan perlekatan dan selanjutnya memfagosit antigen tersebut (Guyton dan Hall, 2008). Proses kemotaksis pada sel akan bermigrasi sebagai fagosit yang mengontrol kontaminasi lokal dan mencegah terjadinya infeksi (Firman, 2007). Netrofil berada di lokasi infeksi terjadi dimana terdapat antigen/bakteri berada kemudian akan langsung mengadakan perlekatan dengan antigen/bakteri. Bakteri akan mengadakan proses perlekatan dengan dengan sel inang melalui interaksi hidrofobik, yaitu reaksi perlekatan antara partikel hidrofobik (menolak air)

pada membran sel bakteri dengan membran sel inang (Baratawidjaja, 1996). Perlekatan atau adhesi tersebut juga dapat dipermudah oleh proses opsonisasi, sehingga opsonin yang mengikat bakteri mudah melekat pada reseptor fraksi Fc antibodi dan komplemen yang diaktifkan di membran sel netrofil (Ferencik, 1993; Eales, 1997; Bellanti, 1993; Baratawidjaja, 1996).

Inflamasi yang berlebihan akan mengakibatkan penurunan fungsi jaringan dan menyebabkan perusakan jaringan di sekitarnya oleh sel-sel radang termasuk pada sel radang netrofil. Sebuah sel netrofil dapat memfagositosis tiga sampai dua puluh bakteri dan mengeluarkan mediator–mediator inflamasi penyebab gejala pada tubuh sebelum sel itu menjadi inaktif dan mati. Lisosom pada sel netrofil berisi enzim lisozim yang berfungsi sebagai pencernaan antigen yang masuk. Lisosom memiliki membran yang mencegah enzim lisozim berkontak langsung dengan zat lain di dalam sel dengan demikian mencegah kerja pencernaannya. Sel netrofil lisis menyebabkan membran pada lisosom juga pecah dan keluar ke jaringan normal, sehingga enzim lisozim mencerna atau merusak jaringan normal (Guyton dan Hall, 2008).

Streptococcus mutans (*S.mutans*) merupakan bakteri anaerob fakultatif gram positif yang merupakan bakteri penyebab karies gigi (Lehner, 1992). *S. mutans* dapat bekerja dengan mendemineralisasi email gigi hasil fermentasi asam dan selanjutnya menginvasi dentin dan pulpa menyebabkan iritasi pada pulpa dan periradikuler. Adanya bakteri yang masuk ke pulpa merupakan salah satu penyebab terjadinya proses inflamasi pada pulpa. Penyakit pada pulpa dapat diklasifikasikan secara klinis menjadi pulpitis reversibel, pulpitis ireversibel dan nekrosis pulpa (Grossman, 2001).

Polifenol biji kakao diduga memiliki efek antiinflamasi dengan menghambat perlekatan bakteri pada reseptor membran sel netrofil dengan menurunkan fungsi hidrofobitas membran sel pada proses perlekatan melalui interkasi hidrofobik. Antinflamasi diberikan untuk memperlambat atau membatasi proses perusakan jaringan normal akibat dari pengeluaran enzim lisozim pada sel netrofil yang lisis.

1.2 Rumusan Masalah

Dari uraian di atas dapat dirumuskan masalah:

- a. Apakah ada pengaruh daya adhesi *S. mutans* pada netrofil yang diinkubasi ekstrak polifenol biji kakao?
- b. Berapa konsentrasi yang paling efektif untuk menurunkan daya adhesi *S. mutans* pada netrofil yang diinkubasi ekstrak polifenol biji kakao?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

- a. Membuktikan manfaat pengaruh ekstrak polifenol biji kakao dalam menurunkan daya adhesi *S. mutans* pada netrofil.
- b. Mengetahui konsentrasi ekstrak polifenol biji kakao yang paling efektif dalam menurunkan daya adhesi *S. mutans* pada netrofil.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan:

- a. Dapat memberikan masukan terhadap ilmu pengetahuan tentang adanya pengaruh daya adhesi *S. mutans* pada netrofil yang diinkubasi ekstrak polifenol biji kakao.
- b. Menginformasikan kepada masyarakat bahwa kakao mempunyai manfaat kesehatan yang baik untuk dikonsumsi.
- c. Dapat digunakan sebagai acuan untuk studi intervensi selanjutnya dalam memaksimalkan peran ekstrak polifenol biji kakao apabila penelitian ini terbukti dapat menurunkan daya adhesi *S. mutans* pada netrofil.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kakao (*Theobroma cacao L*)

Pohon kakao (*Theobroma cacao L*) memiliki sejarah dari beberapa negara di dunia. Diperkirakan pohon kakao mula-mula tumbuh di daerah Amazon utara sampai ke Amerika Tengah dan melewati Chiapas bagian paling selatan Meksiko. Orang Olmec memanfaatkan pohon kakao untuk membuat coklat di sepanjang pantai teluk di selatan Meksiko sekitar 1000 tahun SM. Peradaban pertama yang mendiami daerah Mesoamerika itu mengenal pohon “*kakawa*” yang buahnya dikonsumsi sebagai minuman. Bagi suku Aztec biji kakao yaitu “makanan dewa” (Weisburger, 2001).

2.1.1 Klasifikasi Kakao

Klasifikasi dari tanaman kakao sebagai berikut:

| | |
|------------|----------------------------|
| Dunia | : Plantae |
| Divisi | : Spermatophyta |
| Sub divisi | : Angiospermae |
| Kelas | : Dicotyledonae |
| Sub kelas | : Dialypetaleae |
| Bangsa | : Malvales |
| Suku | : Sterculiaceae |
| Marga | : <i>Theobroma</i> |
| Spesies | : <i>Theobroma cacao L</i> |

Menurut Sunanto (1992), terdapat 3 jenis tanaman buah kakao yang banyak dibudidayakan, yaitu : (a) Cricollo, mempunyai buah yang berwarna merah atau hijau, bijinya berbentuk bulat telur dan berukuran besar dengan kotiledon berwarna putih pada waktu basah. Jenis ini menghasilkan biji kakao yang bermutu baik, seperti

kakao mulia atau edel kakao; (b) Forastero, mempunyai buah yang berwarna hijau, bijinya tipis atau gepeng dengan kotiledon berwarna ungu pada waktu masih basah. Biji yang dihasilkan dari jenis ini mempunyai mutu sedang atau dikenal dengan bulk kakao; (c) Trinitario, mempunyai buah yang berwarna hijau atau merah dengan bentuk biji yang bermacam-macam. Kotiledonnya berwarna ungu tua pada waktu basah. Biji yang dihasilkan jenis ini termasuk jenis edel kakao ataupun bulk kakao.

2.1.2 Morfologi Kakao

Morfologi buah kakao terdiri atas bagian kulit, plasenta, pulp dan biji. Kulit buah mempunyai 10 alur dan tebalnya 1-2 cm. Buah kakao (Gambar 2.1) yang masak mempunyai kulit tebal dan berisi 30-40 biji yang dikelilingi pulp yang berlendir. Pada buah muda, biji menempel pada kulit bagian dalam, tetapi bila buah masak maka biji akan lepas dari kulit buah dan akan berbunyi bila digoncang (Siregar, 2005).



Gambar 2.1 Pohon dan buah kakao (Sumber: Sumadi dalam Harjo, 2010)

2.1.3 Habitat Kakao

Tanaman ini dapat tumbuh dengan baik pada area 30-300 meter, pada suhu sedang yaitu berkisar 18-30 derajat celsius dan membutuhkan kelembapan udara yang cukup dengan curah hujan 1-5 liter/m² per tahun. Tanaman kakao dapat tumbuh pada tanah yang memiliki kisaran pH 4,0-8,5 (Weisburger, 2001).

2.1.4 Kandungan Kimia Biji Kakao

Kandungan biji kakao sangat beragam dan memiliki manfaat dan kekurangan masing-masing. Biji kakao mengandung lemak 31%, karbohidrat 14% dan protein 9%. Protein coklat kaya akan asam amino triptofan, fenilalanin, dan tirosin. Meski kakao mengandung lemak tinggi namun relatif tidak mudah tengik karena kakao juga mengandung polifenol (6%), berfungsi sebagai antioksidan pencegah ketengikan. 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% (Susanto, 1994).

Lemak kakao merupakan produk yang banyak diambil dari tanaman ini karena bernilai ekonomis tinggi. Sementara lemaknya dimanfaatkan, bubuk kakao tertinggal menjadi produk substandar yang tidak banyak dimanfaatkan atau menjadi produk sisa. Kandungan polifenol total dalam produk kakao berbeda-beda, namun kandungan polifenol pada bubuk kakao adalah yang terbesar (Wollgast dan Anklam, 2000).

Tabel 2.1 Kandungan total polifenol produk kakao

| Produk Kakao | Jumlah polifenol total (g /100 g) |
|------------------|--------------------------------------|
| Bubuk cokelat | 2,00 |
| Cokelat batangan | 0,84 |
| Susu cokelat | 0,50 |

Sumber: Wollgast dan Anklam (2001)

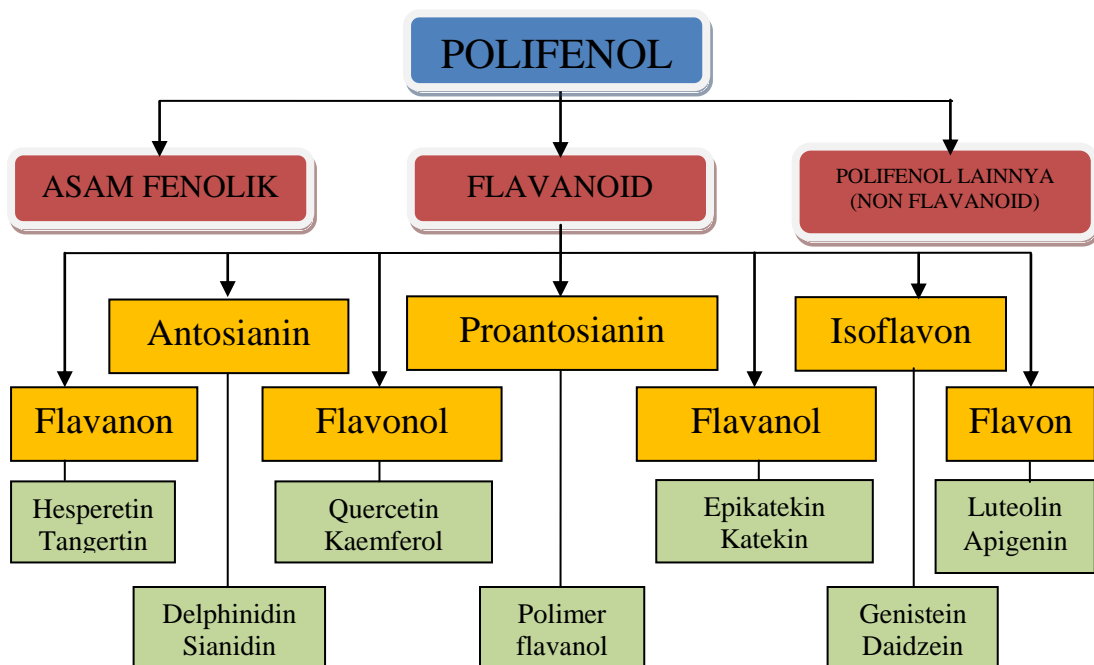
2.1.5 Polifenol Biji kakao

Polifenol yang juga dikenal dengan nama soluble tanin, merupakan metabolit sekunder yang terdapat dalam daun, biji dan buah dari tumbuhan tingkat tinggi. Keberadaannya dalam bidang pangan menjadi penting setelah ia dijadikan bagian diet manusia dan menyumbang citarasa makanan (Baxter *et al.* dalam Misnawi, 2003b). Polifenol dalam produk cokelat bertanggung jawab atas pembentukan rasa sepat melalui mekanisme pengendapan protein – protein yang kaya prolin dalam air ludah

dan menyumbang rasa pahit khas cokelat bersama alkaloid, beberapa amino, peptida dan pirazin (Misnawi,2003a).

Senyawa yang termasuk kedalam polifenol ini adalah semua senyawa yang memiliki struktur dasar berupa fenol. Fenol merupakan struktur yang terbentuk dari benzena tersubstitusi dengan gugus-OH yaitu benzanol (C_6H_5OH) (Fessenden,1982).

Polifenol memiliki fungsi sebagai antiinflamasi yang telah dibuktikan baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. Polifenol memiliki 3 sub kelas antara lain: flavonoid, asam fenolik, dan polifenol lainnya (non flavanoid). flavanoid mempunyai 7 kelas utama yaitu *antochyanin*, *proantochyanin*, *isoflavone*, *flavanone*, *flavonol*, *flavanol*, dan *flavone* (Gambar 2.2). Mekanisme polifenol sebagai antiinflamasi yaitu dengan menghambat pelepasan asam arakidonat dan sekresi enzim lisozim dari sel netrofil dan sel endotelial dan menghambat fase proliferasi dan fase eksudasi dari proses inflamasi. Polifenol sebagai antiinflamasi mampu menghambat perlekatan bakteri dengan cara mengikat protein permukaan bakteri dan menurunkan hidrofobisitas reseptor membran sel fagosit (Hamsari, 2010).



Gambar 2.2 Pembagian kelas polifenol (Sumber: Murphy *et al*, 2003)

2.2 Inflamasi

Inflamasi merupakan respon terhadap cedera jaringan dan infeksi. Ketika proses inflamasi berlangsung, terjadi reaksi vaskular dimana cairan, elemen-elemen darah, sel darah putih dan mediator kimia berkumpul pada tempat cedera jaringan atau infeksi. Inflamasi merupakan suatu mekanisme perlindungan untuk menetralkan dan membasmi agen-agen yang berbahaya pada tempat cedera dan mempersiapkan keadaan untuk perbaikan jaringan (Kee dan Hayes, 1996). Inflamasi merupakan reaksi tubuh terhadap bahan infeksi, bahan infeksi, antigen atau merupakan cedera fisik, pada reaksi ini terjadi tiga proses utama yaitu: (1) aliran darah ke daerah inflamasi meningkat; (2) permeabilitas kapiler meningkat; (3) leukosit, netrofil dan makrofag, lalu limfosit keluar dari kapiler dan menuju jaringan sekitarnya dan menuju jaringan yang cedera dengan pengaruh stimulus kemotaktik (Noer dan Wasradji, 1996).

Ciri khas inflamasi dikenal dengan tanda-tanda utama inflamasi, yaitu: (a) *Eritema* (kemerahan), kemerahan terjadi pada tahap pertama dari proses inflamasi. Darah berkumpul pada daerah cedera jaringan akibat pelepasan mediator kimia tubuh (kinin, prostaglandin, histamin); (b) *edema* (pembengkakan) pembengkakan yaitu tahap kedua dari inflamasi. Plasma merembes ke dalam jaringan intestinal tempat cedera. Kinin mendilatasi arteriol meningkatkan permeabilitas kapiler; (c) *kolor* (panas), panas pada tempat inflamasi disebabkan oleh bertambahnya pengumpulan darah dan mungkin juga karena pirogen (substansi yang menimbulkan demam) yang mengganggu pusat pengatur panas di hipotalamus; (d) *dolor* (nyeri), nyeri disebabkan oleh pembengkakan dan pelepasan mediator-mediator kimia; (e) *functio laesa* (hilangnya fungsi), karena penumpukan cairan pada tempat cedera jaringan, rasa nyeri, mengurangi mobilitas pada daerah inflamasi (Kee dan Hayes, 1996).

Selama berlangsungnya inflamasi, banyak senyawa-senyawa yang dilepaskan secara lokal (Wilmana, 1995), antara lain: (a) histamin, merupakan mediator pertama dalam proses inflamasi yang menyebabkan dilatasi arteriol dan meningkatkan permeabilitas kapiler sehingga plasma darah dapat meninggalkan kapiler dan mengalir ke daerah cedera; (b) kinin, menyebabkan dilatasi arteriol, meningkatkan

permeabilitas kapiler dan menimbulkan rasa nyeri; (c) leukotrien, mempunyai efek kemotaksis yang kuat pada eosinofil, netrofil, dan makrofag serta meningkatkan bronkhokonstriksi dan perubahan-perubahan dalam permeabilitas pembuluh darah (Katzung, 2000). Baik prostaglandin maupun leukotrien bertanggung jawab terhadap sebagian besar gejala-gejala peradangan. Endoperoksida maupun asam hidroperoksi akan melepaskan radikal-radikal oksida yang turut bertanggungjawab bagi rasa nyeri (Wilmana, 1995); (d) prostaglandin, mempunyai berbagai efek pada pembuluh darah, ujung-ujung saraf dan sel-sel yang terlibat dalam inflamasi (Katzung, 2000).

Netrofil yang aktif mampu secara langsung mengaktivasi sel mast untuk dapat melepaskan mediator-mediator inflamasi. Selama aktivasi, netrofil jugamelepaskan beberapa produk atau substansinya ke ekstrasel. Substansi tersebut antara lain enzim lisosomal, produk radikal oksigen seperti superoksida, dan produk metabolisme asam arakhidonat termasuk prostaglandin dan leukotrien (Abbas, 2005).

Ekspresi radang yang berlebihan akan merusak atau merugikan dari sel host sendiri. Terdapat tiga mekanisme yang digunakan untuk menekan peradangan yaitu pertama penghambatan enzim siklooksigenase. Siklooksigenase mengkatalisa sintesa mediator kimiawi yaitu prostaglandin. Mekanisme kedua ialah untuk mengurangi peradangan dengan melibatkan penghambatan fungsi-fungsi imun, salah satunya yaitu mencegah perlekatan sel radang dengan antigen. Mekanisme ketiga yaitu mengantagonis efek kimia yang dilepaskan oleh sel imun (Olson, 2003).

Pengobatan pasien dengan inflamasi mempunyai 2 tujuan utama, yaitu : untuk meringankan rasa nyeri yang sering kali merupakan gejala awal yang terlihat dan keluhan utama yang terus menerus dari pasien serta memperlambat atau membatasi proses perusakan jaringan yang akan terjadi akibat proses inflamasi (Katzung, 2001).

2.3 Inflamasi Pada Pulpa Gigi

Penyebab paling umum inflamasi dalam pulpa yaitu bakterial. Bakteri dapat masuk ke dalam pulpa melalui tubuli dentin yang terbuka, baik dari karies maupun terbukanya pulpa karena trauma, adanya kebocoran pada restorasi, dari perluasan

infeksi pada gingiva atau melalui peredaran darah. Mikroorganisme berperan penting dalam penyakit pulpa. Ada atau tidaknya iritasi bakteri adalah faktor penentu dalam kelangsungan hidup pulpa setelah pulpa terbuka secara mekanis (Grossman, 2005).

Spesies bakteri yang ditemukan dalam pulpa yang terinflamasi ada banyak sekali dan bervariasi. Mikroorganisme tidak perlu ada di dalam pulpa yang terbuka untuk menghasilkan inflamasi pulpa, karena produk bakteri di dalam dentin cukup mengiritasi untuk menyebabkan reaksi inflamasi pulpa. Bakteri sering ditemukan pada pulpa yang terinfeksi adalah *streptococci* dan *staphylococci* (Grossman, 2005).

Bakteri dapat masuk ke dalam pulpa melalui tiga cara: (1) invasi langsung melalui dentin, seperti misalnya karies, fraktur mahkota atau akar, terbukanya pulpa pada saat preparasi kavitas, atrisi, abrasi, erosi, atau retak pada mahkota; (2) invasi melalui pembuluh darah atau limfatik terbuka, yang ada hubungannya dengan penyakit periodontal, suatu kanal aksesori pada daerah furkasi, infeksi gingiva, atau pada saat skalling gigi; (3) invasi melalui darah, misalnya selama penyakit infeksius atau bakteremia resisten. Bakteri dapat menembus dentin pada saat preparasi kavitas karena kontaminasi lapisan *smear*, karena penetrasi bakteriti pada tubuli dentin terbuka disebabkan oleh proses karies, dan oleh masuknya bakteri karena tindak operatif yang tidak steril. Bakteri dan toksin menembus tubuli dentin dan saat mencapai pulpa akan dapat menyebabkan reaksi inflamasi (Grossman, 2005).

Reaksi pulpa pada daerah yang terlibat dalam suatu respon inflamasi. Leukosit polimorfonuklear mencapai daerah tersebut dan selanjutnya penyebaran bakteri lebih dalam ke dalam pulpa dapat dicegah. Reaksi pada pulpa yang meradang berbeda dari reaksi daerah lain yang mengalami peradangan, hal ini dikarenakan ruangan dari pulpa tertutup seluruhnya dari dinding dentin yang keras, kecuali pada daerah bagian foramen apikal. Bila inflamasi berlanjut maka akan meluas lebih dalam ke dalam pulpa. Eksudat inflamasi yang cukup banyak menumpuk dan menyebabkan rasa sakit karena adanya tekanan pada ujung saraf. Daerah nekrosis berkembang karena gangguan dalam suplai nutrisi, banyak leukosii polimorfonuklear mati, dan terbentuk nanah akan mengiritasi sel saraf (Grossman, 2005).

Inflamasi pulpa secara klinis dapat diklasifikasikan menjadi tiga yaitu pulpitis reversible, pulpitis ireversibel dan nekrosis pulpa. Pulpitis reversibel adalah suatu kondisi inflamasi pada pulpa ringan sampai sedang yang disebabkan oleh beberapa stimuli, tetapi pulpa mampu kembali pada keadaan tidak terinflamasi setelah stimuli stimuli ditiadakan. Rasa sakit yang berlangsung sebentar dapat dihasilkan oleh stimuli termal pada pulpa yang mengalami inflamasi reversibel, tetapi rasa sakit hilang segera setelah stimuli dihilangkan. Penyebab pulpitis reversibel disebabkan oleh apa saja yang mampu melukai pulpa. Penyebab dapat berasal dari: trauma oklusal: syok termal saat preparasi kavitas dengan bur yang terlalu lama; dehidrasi kavitas dengan alkohol atau kloroform yang berlebihan; adanya bakteri yang masuk ke dalam pulpa. Gejala pada pulpitis reversibel ditandai oleh rasa sakit yang tajam namun sebentar saat adanya rangsangan misalnya pada saat makan atau minum. Pada pulpitis reversibel rasa sakit tidak terjadi secara spontan (Grossman, 2005).

Pulpitis ireversibel adalah suatu kondisi inflamasi pulpa yang persisten. Rasa sakit yang ditimbulkan pada pulpitis reversibel berlangsung sangat lama dan tetap ada setelah stimulus dihilangkan. Penyebab paling umum pada pulpitis ireversibel adalah keterlibatan bakterial pulpa melalui karies gigi. Pulpitis reversibel dapat memburuk menjadi pulpitis ireversibel (Grossman, 2005).

Nekrosis pulpa adalah matinya pulpa. Dapat sebagian atau seluruhnya, tergantung pada apakah sebagian atau seluruh pulpa yang terlibat. Penyebab pada nekrosis pulpa yaitu dapat karena trauma, bakteri dan iritasi kimiawi. Gejala yang nampak yaitu diskolorasi gigi yaitu perubahan warna gigi menjadi keabu-abuan atau kecoklat-coklatan yang nyata (Grossman, 2005).

2.4 Netrofil

Plasma darah terdiri atas *eritrosit* (sel darah merah), *leukosit* (sel darah putih) dan *trombosit* (platelet) (Watson, 2002) dan komposisi leukosit yaitu 7 juta leukosit/ml, yang hanya sekitar 1/700 dari konsentrasi eritrosit, lihat Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Persentase tipe dari sel darah putih (Sumber: Guyton dan Hall, 1997)

| Tipe Sel Darah Putih | Persentase |
|----------------------|------------|
| Netrofil | 62 % |
| Eosinofil | 2,3 % |
| Basofil | 0,4 % |
| Limfosit | 30 % |
| Monosit | 5,3 % |

Leukosit terdiri dari sebanyak 75 % sel granulosit dan 25 % sel agranulosit yang terbentuk dari dalam sumsum tulang belakang (Baratawidjaya, 1994). Yang termasuk kelompok agranulosit adalah sel limfosit dan monosit, sedangkan basofil, netrofil, dan eosinofil termasuk ke dalam kelompok granulosit (Roitt, 1991).

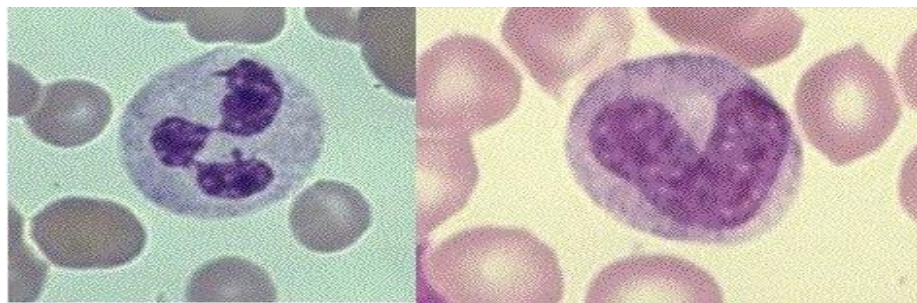
2.4.1 Morfologi Sel Netrofil

Netrofil adalah sel matang yang dapat menyerang dan menghancurkan bakteri, bahkan didalam sirkulasi (Guyton dan Hall, 1997). Karakteristik netrofil adalah memiliki nukleus dengan multi lobus, granula azurofilik, dan granula spesifik yang berwarna ungu pucat pada pengecatan Wright's dan Giemsa (Cruse JM, 2004). Menurut Leeson *et al.* (1996) netrofil termasuk leukosit polimorfonuklear dalam keadaan normal berdiameter 7-9 μm dan dalam hapusan darah kering 10-12 μm .

Inti sel netrofil sangat polimorf dan memperlihatkan berbagai bentuk. Inti umumnya terdiri atas 3 sampai 5 lobus berbentuk lonjong yang tak teratur, yang saling dihubungkan dengan benang- benang kromatin yang halus, berwarna ungu dan berbentuk batang atau segmen (Juncqueira, 1997). Inti berbentuk batang bila lekukan inti melebihi setengah diameter inti dan berbentuk segmen bila inti terbagi menjadi beberapa bagian yang saling dihubungkan dengan benang kromatin. Sel inti motil , amuboid, fagositik aktif, dan memberikan respon kemotaksis (Leeson *et.al.*, 1996).

Netrofil memiliki umur yang pendek, hanya beberapa hari. Terdapat granula yang mengandung sejumlah faktor bakterisidal (Gambar 2.3). Granulosit (leukosit polimorfonuklear atau netrofil) mengandung sedikitnya dua tipe granula, yaitu : (1)

Azurofil atau granula primer dan (2) granula sekunder atau spesifik (Jawetz, 2005). Granula primer ini berdiameter 0,4 mikron (μ) mengandung lisozim, enzim hidrolitik lain dan beberapa protein kationik serta defensin, suatu antimikroba. Granula yang sekunder atau spesifik mengandung laktoferin dan beberapa jenis enzim termasuk kolagenase. Kedua jenis granula ini penting dalam penghancuran benda-benda yang ditelan dan dalam pembunuhan mikroorganisme. Produksi dan pelepasan granulosit diduga dibawah pengendalian faktor seluler humoral (Jawetz, 2005).



Gambar 2.3 Gambaran mikroskopis netrofil (Fankhauser, 2002)

2.4.2 Membran Sel Netrofil

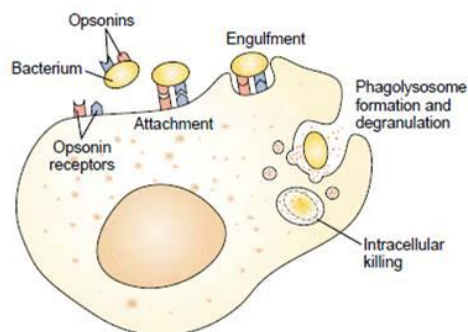
Tebal dari membran sel netrofil yaitu 7,5-10 nanometer dan memiliki fungsi sebagai barier semipermeabel yang memungkinkan molekul yang berukuran kecil dapat keluar masuk ke dalam sel. Perkiraan komposisi membran sel adalah protein 55%, fosfolipid 25%, kolesterol 13%, lipid lain 4% dan karbohidrat 3%. Membran sel netrofil yang berupa lipid bilayer disebut sebagai fluid-mosaic model. Molekul penyusun utama membran adalah fosfolipid yang terdiri dari bagian kepala yang polar (hidrofilik) dan dua ekor non polar (hidrofobik). Fosfolipid ini tersusun oleh bagian nonpolar yang membentuk hidrofobik yang diapit oleh daerah kepala pada bagian dalam dan luar membran (Guyton dan Hall, 1997).

Protein pada membran sel sebagian besar tersusun oleh glikoprotein yang terdiri dari dua jenis yaitu, protein integral yang menembus membran sepenuhnya dan protein perifer yang hanya melekat pada satu sisi atau permukaan membran dan tidak menembus membran sepenuhnya. Protein integral memiliki fungsi sebagai reseptor

dengan interaksi tertentu dengan molekul lain yang spesifik sehingga menimbulkan perubahan bentuk reseptor. Pada netrofil reseptor ini berupa reseptor Fc (FcR) dan reseptor C3b (C3bR) yang berinteraksi dengan antibodi dan mengadakan perlekatan dengan antigen bakteri pada proses opsonisasi (Guyton dan Hall, 1997).

2.4.3 Sifat – Sifat Sel Netrofil

Netrofil merupakan sel yang memiliki peranan penting dalam penyerangan antigen/ bakteri yang masuk ke dalam tubuh. Beberapa sifat yang dimiliki netrofil dalam proses penyerangan pada antigen: (1) diapedesis, sel-sel ini dapat meluncur melewati pori-pori pembuluh darah. Bagian yang meluncur tersebut dalam waktu sebentar dapat menyempit sesuai ukuran pori-pori tersebut; (2) pergerakan amuboid, pergerakannya melalui jaringan-jaringan dengan melakukan pergerakan amuboid; (3) kemotaksis, didalam jaringan dapat dijumpai sejumlah bahan-bahan kimia yang dapat menyebabkan sel-sel netrofil dan makrofag bergerak menuju arahnya atau bahkan menjadi sumber bahan-bahan kimia tadi; (4) fagositosis, sewaktu mendekati sebuah partikel untuk difagositosis, sel-sel netrofil mula-mula mengadakan perlekatan pada reseptor partikel itu kemudian akan menonjolkan pseudopodia ke semua jurusan di sekeliling partikel tersebut dan akan saling bertemu satu sama lainnya pada sisi yang berlawanan dan akan bergabung sehingga terjadilah ruangan tertutup yang berisi partikel-partikel yang sudah di fagosit (Gambar 2.4).



Gambar 2.4 Attachment (adhesi), fagositosis dan pembunuhan bakteri intraseluler (Porth, 2003)

2.4.4 Mekanisme Sel Netrofil Dalam Pertahanan Tubuh

Netrofil merupakan leukosit polimorfonuklear, bersama dengan makrofag adalah sel fagositosis utama (Jawetz, 1996). Netrofil dan makrofag dapat bergerak melalui jaringan dengan gerakan amoeboid dengan kecepatan 40μ /menit, sepanjang ukuran tubuhnya sendiri setiap menit. Netrofil berperan penting pada respon radang akut, dimana terjadi perubahan-perubahan vaskuler dan eksudasi. Beberapa jam setelah dimulai radang akut, terjadi peningkatan jumlah netrofil dalam darah, kadang-kadang sampai empat hingga lima kali lipat dari jumlah normal. Hal ini disebabkan adanya mediator peradangan seperti histamin, bradikinin, serotonin, prostaglandin, beberapa produk sistem komplemen dan produk reaksi pembuluh darah yang akan memasuki aliran darah kemudian ditranspor di sumsum tulang guna menggerakkan netrofil ke dalam sirkulasi untuk menuju daerah radang (Guyton dan Hall, 1997).

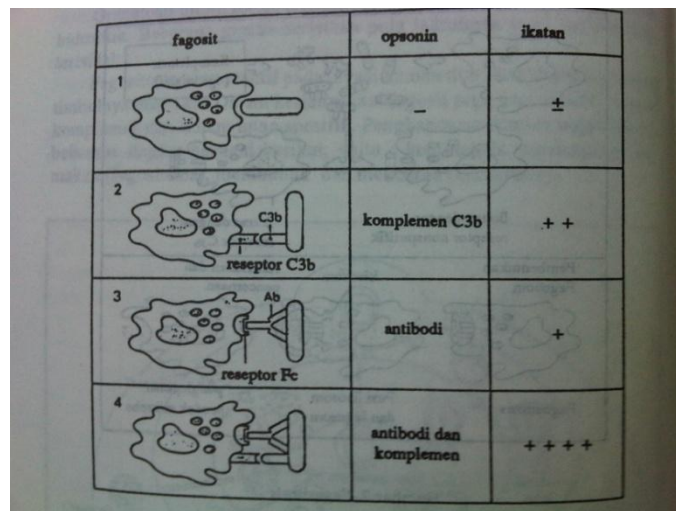
Netrofil mampu bergerak aktif seperti amoeba dan menelan berbagai zat dengan proses yang disebut fagositosis. Proses ini diawali dengan proses perlekatan diantara sel netrofil dengan antigen yaitu melalui intraksi hidrofobik perlekatan antara partikel hidrofobik (menolak air) pada membran sel bakteri dengan membran sel inang. Proses ini dibantu juga dibantu melalui proses opsonisasi dimana opsonin yang mengikat bakteri mudah melekat pada reseptor di membran netrofil. Setelah melekat, netrofil membentuk pseudopodia yang dijulurkan di bakteri, mengelilingi bakteri dan berfusi membentuk vesikel vakuola fagosom (Price, 1994). Membran yang akan menyelimuti bakteri, sedikit menjauh dari permukaan membran dan fagosom akan dimasukkan ke dalam sel. Bakteri yang berada dalam fagosom selanjutnya dibunuh oleh mekanisme bakterisidal (Ferencik, 1993; Eales, 1997; Bellanti, 1993).

Fungsi netrofil yang paling penting adalah memfagositosis antigen yang masuk. Sebuah sel netrofil dapat memfagosit 5-20 bakteri sebelum sel netrofil itu sendiri menjadi inaktif dan mati. Lisosom pada sel netrofil berisi enzim lisozim yang berfungsi sebagai pencernaan antigen yang masuk. Lisosom memiliki membran yang mencegah enzim lisozim berkontak dengan zat lain di dalam sel dengan demikian

mencegah kerja pencernaannya. Sel netrofil yang lisis menyebabkan membran pada lisosom juga pecah dan keluar ke jaringan normal, sehingga enzim lisozim mencerna atau merusak jaringan normal (Guyton dan Hall, 1997).

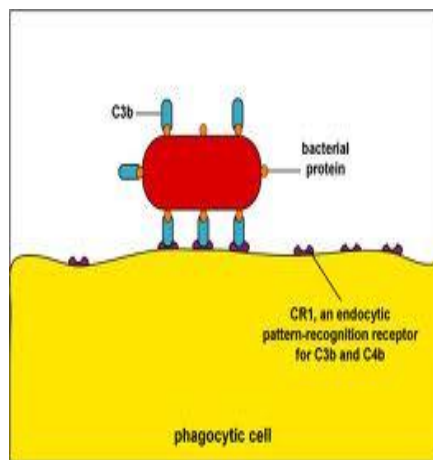
Netrofil memiliki granula yang mengandung protein efektor yang berfungsi dalam fagositosis intraselular maupun untuk dilepaskan ke ekstrasel yang memperbesar inflamasi jaringan. Dalam kerjanya netrofil juga berinteraksi dengan komplemen dan sistem imun spesifik. Antibodi seperti halnya dengan komplemen (C3b) dapat meningkatkan fagositosis (opsonisasi). Antibodi yang mengikat antigen/bakteri akan lebih mudah dikenal oleh netrofil untuk perlekatan dengan reseptor netrofil yang kemudian dihancurkan. Hal tersebut dimungkinkan adanya reseptor fraksi Fc dari imunoglobulin pada permukaan netrofil (Baratawidjaja, 1996).

Berikut merupakan proses opsonisasi pada sel fagosit (netrofil): (1) fagositosis mempunyai kemampuan untuk mengikat mikroorganisme secara langsung; (2) ikatan tersebut terjadi bila bakteri mengaktifkan komplemen C3b; (3) bakteri yang tidak mengaktifkan komplemen dapat diikat fagosit dengan bantuan antibodi (Ab) yang berfungsi sebagai jembatan yang mengikatkan bakteri dengan reseptor Fc pada fagosit; (4) bila ada antibodi bersama C3b, ikatan menjadi lebih mudah (Gambar 2.5).



Gambar 2.5 Opsonisasi (Baratawidjaja, 1996)

Komplemen merupakan molekul dari sistem imun nonspesifik yang ditemukan dalam sirkulasi dalam keadaan tidak aktif, tetapi setiap waktu dapat diaktifkan oleh berbagai bahan seperti antigen, kompleks imun, dan sebagainya. Berbagai mediator yang dilepas pada waktu komplemen diaktifkan salah satunya yaitu C3b yang berfungsi sebagai opsonin dan adherens imun dimana membantu dalam perlekatan antara antigen dengan sel imun (netrofil) (Gambar 2.6).



Gambar 2.6 Perlekatan antigen bakteri, komplemen C3b dan sel fagosit (Sumber: Gary E.Kaiser,2007)

2.5 *Streptococcus mutans*

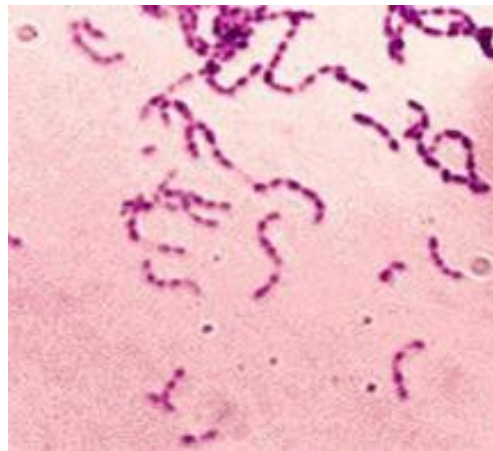
2.5.1 Taksonomi *Streptococcus mutans*

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

(Nugraha, 2007)

Menurut Jawetz (1996), *S. mutans* adalah bakteri gram positif berbentuk bulat yang secara khas membentuk pasangan atau rantai selama masa pertumbuhannya.

Bakteri ini tersebar luas di alam dan beberapa diantaranya merupakan bagian dari flora normal yang terdapat dalam tubuh manusia. *S. mutans* merupakan bagian mikroflora terbesar dalam rongga mulut (Gambar 2.7).



Gambar 2.7 Gambaran mikroskopis koloni *S. mutans* pada epitel lidah (Sumber: Bergey dalam Cappucino, 1998)

2.5.2 Morfologi dan Habitat *Streptococcus mutans*

Bakteri *S. mutans* merupakan jenis bakteri gram positif, bersifat nonmotil. *S. mutans* masuk ke dalam genus mutans streptococci. *S. mutans* bulat atau oval dan tersusun dalam rantai. Bakteri ini tumbuh optimal pada suhu sekitar 18°–40°C (Nugraha, 2008). Bakteri ini tumbuh dalam suasana fakultatif anaerob (Lehner, 1992).

Habitat utama *S. mutans* adalah permukaan gigi namun bakteri ini tidak dapat tumbuh secara bersama ke seluruh permukaan gigi melainkan *S. mutans* sering tumbuh pada area tertentu pada permukaan gigi. Biasanya kita dapat menemukan koloni *S. mutans* dalam pit dan fisur, permukaan oklusal, area proksimal permukaan gigi, gingiva atau pada lesi karies gigi yang sudah mencapai pulpa. Menurut Nolte (1982) dalam keadaan anaerob, bakteri ini memerlukan 5% CO₂ dan 95% nitrogen serta memerlukan amonia sebagai sumber nitrogen agar dapat bertahan hidup dalam lapisan plak yang tebal.

2.5.3 Patogenesis *Streptococcus mutans*

Bakteri *S. mutans* bekerja secara patogen, pada demineralisasi email dari gigi hasil fermentasi asam dalam perkembangan karies gigi. Sehingga mengakibatkan invasi pada dentin oleh mikroorganisme dan pada organisme akhirnya menyebabkan infeksi pulpa (Nolte, 1982). Demineralisasi enamel dan dentin oleh *S. mutans* dapat menyebabkan inflamasi pada pulpa.

2.5.4 Mekanisme Perlekatan Dinding Sel Bakteri Dengan Sel Inang

Dinding sel *S. mutans* terdiri dari 6,8 % protein 8,9 asam *tricoicid gliserol*, 33,6 nonpeptidoglikan polisakarida dan 49,9 peptidoglikan. *S. mutans* memiliki berbagai unsur antigenik di dalam dinding selnya, seperti misalnya antigen protein, polisakarida spesifik, peptidoglikan, dan asam lipoterikoat. Antigen-antigen tersebut menentukan imunogenitas pada *S. mutans*.

Bakteri mengadakan perlekatan dengan dengan sel inang dengan interaksi hidrofobik, yaitu perlekatan antara partikel hidrofobik (menolak air) pada membran sel bakteri dengan membran sel inang. Bakteri *S. Mutans* juga difagosit melalui mekanisme awal perlekatan dengan bantuan opsonisasi oleh imunoglobulin dan aktivasi komplemen. Proses opsonisasi dimulai dengan melapisi partikel antigen (*S. mutans*) oleh antibodi (imunoglobulin) dan komponen komplemen sehingga lebih mudah terjadi perlekatan diantara *S. mutans* dan sel imun/netrofil, dimana membran netrofil memiliki reseptor yang sesuai (Baratawidjaja, 1996).

Sel imun/netrofil berikatan dengan antigen melalui reseptor yaitu reseptor fraksi Fc antibodi dan komplemen yang diaktifkan. Reseptor Fc antibodi akan berikatan dengan antibodi (imunoglobulin) yang melekat pada antigen/bakteri gram positif, sedangkan reseptor komplemen yang diaktifkan akan berikatan dengan komplemen yang diaktifkan, dalam hal ini komplemen C3b.

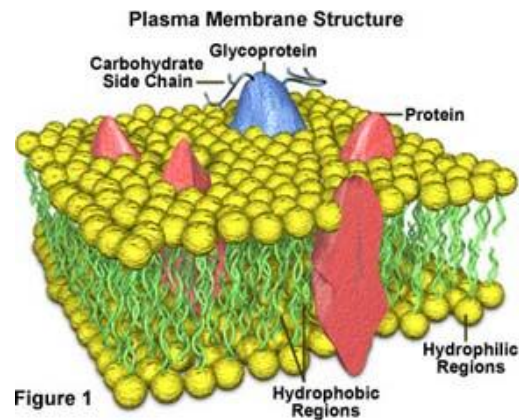
2.6 Indeks Adhesi

Adhesi, berarti gaya tarik menarik atau daya mengumpul antara molekul-molekul dari partikel lain. Bila dua zat berkontak erat satu sama lain, molekul-molekul dari 1 zat mendekat atau ditarik ke molekul dari zat lainnya, gaya ini disebut adhesi (Annusavice,2004). Bioadhesi merupakan adhesi yang terjadi dalam jaringan hidup. Dalam sistem biologis, bioadhesi dapat dibedakan menjadi empat jenis: (1) Adhesi sel yang normal pada sel normal lain. (2) Adhesi sel dengan zat asing. (3) Adhesi sel yang normal terhadap sel patologis. (4) Adhesi suatu adhesif/perekat terhadap zat biologis (Katzung, 2001).

Proses adhesi merupakan tahap awal infeksi bakteri yang berperan dalam kolonisasi bakteri pada permukaan sel inang. Adhesi memperpendek jarak bakteri dengan permukaan sel inang sehingga mempermudah toksin dihasilkan oleh bakteri untuk melekat ke reseptornya. Adhesi dikenal dua bentuk yaitu (1) adhesi bersifat non spesifik, dan (2) adhesi bersifat spesifik (Christensen dan Beachey, 1984).

Perlekatan bakteri pada sel inang berfungsi sebagai penutup dan dapat merupakan langkah awal proses infeksi. Proses ini dipengaruhi oleh interaksi komponen permukaan bakteri dan sel inang dengan faktor lingkungan yang dapat mendukung seperti *fibrinectin* (suatu protein yang bersifat adhesif), *fibrinogen*, *vitronectin* dan *laktoferin*. Struktur yang bertanggung jawab terhadap sifat adhesi bakteri adalah adhesin fimbriae, asam lipoteikoat dan protein adhesin. Interaksi yang terlibat dalam adhesin sebagian besar disebabkan oleh struktur permukaan hidrofob (Doyle and Rosenberg, 1990). Bakteri mengadakan perlekatan dengan sel inang dengan interaksi hidrofobik, yaitu perlekatan antara partikel hidrofobik (menolak air) pada membran sel bakteri dengan membran sel inang.

Perlekatan yang terjadi dari sel radang netrofil dan bakteri antigen juga diperantarai oleh ikatan komplemen C3b yang berfungsi untuk opsonisasi dan adherens imun dan antibodi (imunoglobulin) yang melekat pada antigen, sehingga terjadi perlekatan yang nantinya diteruskan dengan memfagositosis bakteri tersebut.



Gambar 2.8 Struktur membran (Sumber: Sherwood. L., 2001)

Pada penelitian Wahyudi (2007) tentang adhesi dan aktifitas fagositosis sel polimorfonuklear terhadap *Staphylococcus aureus* asal susu sapi perah dan manusia yang bersifat multiresisten terhadap antibiotik, juga disebutkan bahwa indeks adhesi dan fagositosis dari sel netrofil ditentukan dengan menghitung jumlah bakteri yang menempel dan yang difagosit oleh setiap sel netrofil dari 10 sel netrofil pada setiap preparat hapus, dengan menggunakan mikroskop. Berdasarkan penelitian tersebut maka dapat disimpulkan bahwa indeks adhesi adalah banyaknya bakteriyang melekat pada sel inang persatuan jumlah sel inang (Santosaningsih, 2004).

2.7 Hipotesis

Berdasarkan tinjauan pustaka dapat ditarik hipotesis bahwa ada penurunan daya adhesi *S. mutans* pada netrofil yang diinkubasi ekstrak polifenol biji kakao.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental labolatoris *in vitro*. Dipilih karena pada tiap sampel perlakuan terkendali, terukur dan pengaruh perlakuan dipercaya. Rancangan penelitian ini yaitu dengan kelompok kontrol (*The Post Test Only Control Group Design*) (Notoatmojo, 2005).

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

3.2.1 Waktu Penelitian

Pelaksanaan penelitian dilakukan pada bulan Agustus-September 2011.

3.2.2 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di :

- a. Laboratorium Bioscience, Rumah Sakit Gigi dan Mulut
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- b. Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia
Jl. PB. Sudirman 90 Jember Jawa Timur.

3.3 Identifikasi Variabel

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak polifenol biji kakao.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah indeks adhesi bakteri *S. mutans* terhadap sel radang akut netrofil.

3.3.3 Variabel Terkendali

- a. Konsentrasi polifenol biji kakao
- b. Isolat netrofil

3.4 Sampel

Penelitian ini menggunakan sampel berupa netrofil yang diisolasi dari darah vena perifer/ vena tepi orang yang sehat (tidak memiliki penyakit sistemik).

3.5 Definisi Operasional

3.5.1 Ekstrak Polifenol Biji Kakao

Ekstrak polifenol biji buah kakao yang digunakan dalam penelitian ini didapat langsung dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia.

3.5.2 Netrofil

Netrofil diambil dari darah vena perifer/ vena tepi orang yang sehat (tidak memiliki kelainan sistemik). Isolasi netrofil dilakukan dengan menggunakan teknik *gradient density* menggunakan bahan *Ficoll Hypaque Centrifugation*.

3.5.3 *Streptococcus mutans*

Bakteri *S. mutans* yang dipakai adalah ATCC *strain* nomor 2517 diambil dari Universitas Airlangga Surabaya. *S. mutans* berdiameter 0,5-0,75 μm koloni agak kasar, tersusun dalam bentuk rantai dan bergerombol (Mc Ghee, 1982) dalam Pratama (2005). Bakteri ini tumbuh secara optimal pada suhu sekitar 18⁰ - 40⁰ Celsius (Nugraha, 2008). *S. mutans* stok dilakukan pewarnaan dan dengan densticheck diatur agar kepekatan *S. mutans* menjadi 0,5 McFarland untuk mempermudah penghitungan uji indeks adhesi di bawah mikroskop. Pembuatan suspensi kuman menggunakan perbandingan standar McFarland 0,5 (Vandepitte et al., 1991).

3.5.4 Indeks Adhesi

Indeks adhesi yaitu banyaknya bakteri yang melekat pada satu sel dan dihitung sampai seratus sel dan dibuat rata-ratanya tiap kelompok perlakuan. Pada penelitian ini digunakan penghitungan indeks adhesi yaitu banyaknya bakteri *S. mutans* yang melekat pada sel radang netrofil, lalu dihitung dengan menggunakan mikroskop inverted dan mikroskop trinokuler baik kelompok kontrol maupun kelompok yang diberi perlakuan ekstrak, kemudian diambil rata-rata tiap sampel kelompok.

3.6 Alat dan Bahan

3.6.1 Alat

- | | |
|---|--|
| a. Tabung reaksi (Pyrex, <i>Japan</i>) | i. Coverglass |
| b. Tabung falcon | j. Pipet Mikro/ <i>blue and yellow tip</i> |
| c. <i>Centrifuge</i> (Hettich, <i>Germany</i>) | k. Petridish kecil |
| d. Mikroskop inverted | l. Tabung heparin |
| e. Inkubator (WTC Binder, <i>Germany</i>) | m. Inkubator CO ₂ |
| f. <i>Torniquet</i> | n. Densticheck |
| g. <i>Syringe</i> 5ml | o. <i>Laminar Flow</i> |
| h. Vortex | p. Mikroskop trinokuler |

3.6.2 Bahan

- | | |
|---|-------------------------|
| a. <i>S. mutans</i> ATCC strain no 2517 | e. Alkohol |
| b. Aquadest steril | f. Polifenol biji kakao |
| c. Darah vena perifer | g. HBSS |
| d. <i>Ficoll Hypaque Gradient</i> | h. <i>Dextran</i> 6% |

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Preparasi Polifenol Biji Coklat (*Theobroma cacao* L)

- a. Mempersiapkan bubuk biji kakao.

Bijibuah kakao basah yang telah selesai dipisahkan plasentanya menggunakan air kemudian dikeringkan dengan sinar matahari selama 7 jam, dilanjutkan dengan pengeringan oven pada suhu 50 °C sampai kadar air 7,5%. Selanjutnya biji kakao yang telah dihaluskan dengan blender kemudian dipisahkan lemaknya (defatting) dengan pengepresan sistem hidrolik 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).

- b. Pemisahan senyawa polifenol biji kakao kering non fermented.
Bubuk biji kakao yang diperoleh kemudian dipisahkan polifenolnya dengan pelarut alkohol dengan perbandingan pelarut dan bahan 1 : 3 (100 g : 300 ml). Bahan disaring dengan bantuan pompa vakum agar larutan benar-benar terpisah dari rafinat (endapan bahan). Selanjutnya akan dilakukan proses evaporasi yang menggunakan evaporator berputar pada suhu 4-50 °C sehingga dapat dihasilkan konsentrat polifenol yang pekat. Kemudian polifenol tersebut diletakkan pada oven dengan suhu 60 °C selama 50 jam (Harmawan, 2010).
- c. Kemudian diekstraksi sesuai dengan konsentrasi yang akan dicari yakni 50% dan 100% dengan diencerkan menggunakan akuades. Dimana konsentrasi 50% mewakili konsentrasi terkecil dan pada konsentrasi 100% untuk mewakili konsentrasi terbesar untuk melihat apakah ada pengaruh dalam proses adhesi.
- d. Setelah dilakukan pemisahan konsentrasi, untuk mengurangi kepekatan dengan disentrifuge selama 10 menit 3000 rpm, didapatkan supernatan yang tidak terlalu pekat. Hal ini dimaksudkan agar penampakan mikroskopis mudah diamati.

3.7.2 Isolasi Netrofil

- a. Darah diambil dari vena perifer orang yang sehat sebanyak 9 cc yang kemudian dicampur dengan bahan antikoagulan (heparin).
- b. 9 cc darah (*heparide wholeblood*) dibagi menjadi 2 tabung.
- c. Serum dan platelet dipisahkan dengan disentrifuge selama 10 menit, 650 rpm
- d. Kemudian bagian teratas berupa serum dipindahkan ke tabung falcon lainnya.

- e. Platelet yang sudah dipisahkan dari serum diencerkan dengan HBSS dengan perbandingan 1:2
- f. Dilakukan pipeting untuk menghomogenkan.
- g. Isolasi netrofil dilakukan menggunakan teknik *gradient density* dengan *Ficoll Hypaque Centrifugation*.
- h. Darah yang sudah diencerkan dengan HBSS dialirkan melalui dinding tabung yang telah berisi 3 cc larutan *Ficoll*, sehingga sel-sel darah yang mempunyai gradien lebih tinggi dari *Ficoll* akan turun ke bawah.
- i. Tabung ditutup dan disentrifuge selama 30 menit, 1350 rpm pada suhu kamar sehingga terbentuk empat lapisan berturut-turut dari bawah ke atas adalah eritrosit dan netrofil, *Ficoll*, limfosit dan cairan plasma.
- j. Cairan plasma, limfosit, dan *Ficoll Hypaque Gradient* dipisahkan .
- k. Lapisan terbawah yang mengandung netrofil diresuspensi dengan HBSS sebanyak 6 cc.
- l. Kemudian ditambahkan dengan dekstran 6% sebanyak 1ml
- m. Dicampur dengan pipeting dan kemudian dibiarkan selama 90 menit.
- n. Supranatan mengandung netrofil diaspirasi.
- o. Ditambahkan 1 cc HBSS, divortex kemudian disentrifuge 1700 rpm, 10 menit (diulang sampai 2 kali pengulangan).
- p. Lapisan paling atas dibuang dan diresuspensi dalam 400 µl RPMI
- q. Dicek dahulu dibawah mikroskop dengan membuat hapusan.

3.7.3 Preparasi *S. mutans*

- a. Isolat *S. mutans* diambil dari *S. mutans* ATCC strain nomor 2517..
- b. Dengan densicheck diatur agar kepekatan *S. mutans* menjadi 0,5 McFarland diencerkan menggunakan aquadest steril dengan demikian suspensi isolat *S. mutans* siap digunakan.

3.7.4 Indeks Adhesi

a. Perlakuan Uji Indeks Adhesi

- 1) 6 coverslip yang telah disterilkan diletakkan dalam 6 petridish kecil .
- 2) Netrofil kemudian ditapiskan pada masing masing coverslip (@50 µl) kemudian diinkubasi selama 30 menit, 37⁰C agar netrofil melekat.
- 3) Dilakukan pengecekan dibawah mikroskop.
- 4) Netrofil dicuci 2 kali dan diresuspensi dengan 1000 µl suspensi RPMI.
- 5) Ekstrak polifenol biji kakao diberikan terhadap 4 dari 6 petridish kecil sebanyak masing-masing 50 µL. Pada 2 petridish kecil kelompok kontrol tidak diberi ekstrak namun ditambahkan 50 µL RPMI (sebagai kontrol, resting netrofil).
- 6) Dilakukan pipeting untuk mencampur.
- 7) Dilakukan inkubasi selama kurang lebih 12 jam dalam suhu 37⁰C.
- 8) Setelah 12 jam dilakukan pengecekan dibawah mikroskop pengaruh sel yang sudah diberikan ekstrak polifenol biji kakao dan pada kelompok kontrol.
- 9) Mempersiapkan *s.mutans* dan dilakukan pengecekan dibawah mikroskop terlebih dahulu untuk mendapatkan jumlah *s.mutans* yang tidak terlalu banyak agar dapat dilakukan pengamatan.
- 10) Ditambahkan 200 µl suspense *S. mutans* secara perlahan
- 11) Diinkubasikan selama 3 jam dalam suhu 37⁰C, 5% CO₂.
- 12) Kemudian dilanjutkan dengan mengamati indeks adhesi tiap-tiap sampel dan diambil gambarnya dalam kamera mikroskop inverted.
- 13) Membuang medium inkubasi dan sel dicuci dengan RPMi kemudian difiksasi menggunakan etanol.
- 14) Setelah itu dicuci dengan aquadest dan dikeringkan dengan diangin-anginkan kemudian dicat dengan *Giemsa*.
- 15) Hasil preparat yang sudah dicat dengan *Giemsa*, diamati dengan mikroskop trinokuler pembesaran 1000x dan dilakukan penghitungan jumlah bakteri yang menempel pada sel netrofil.

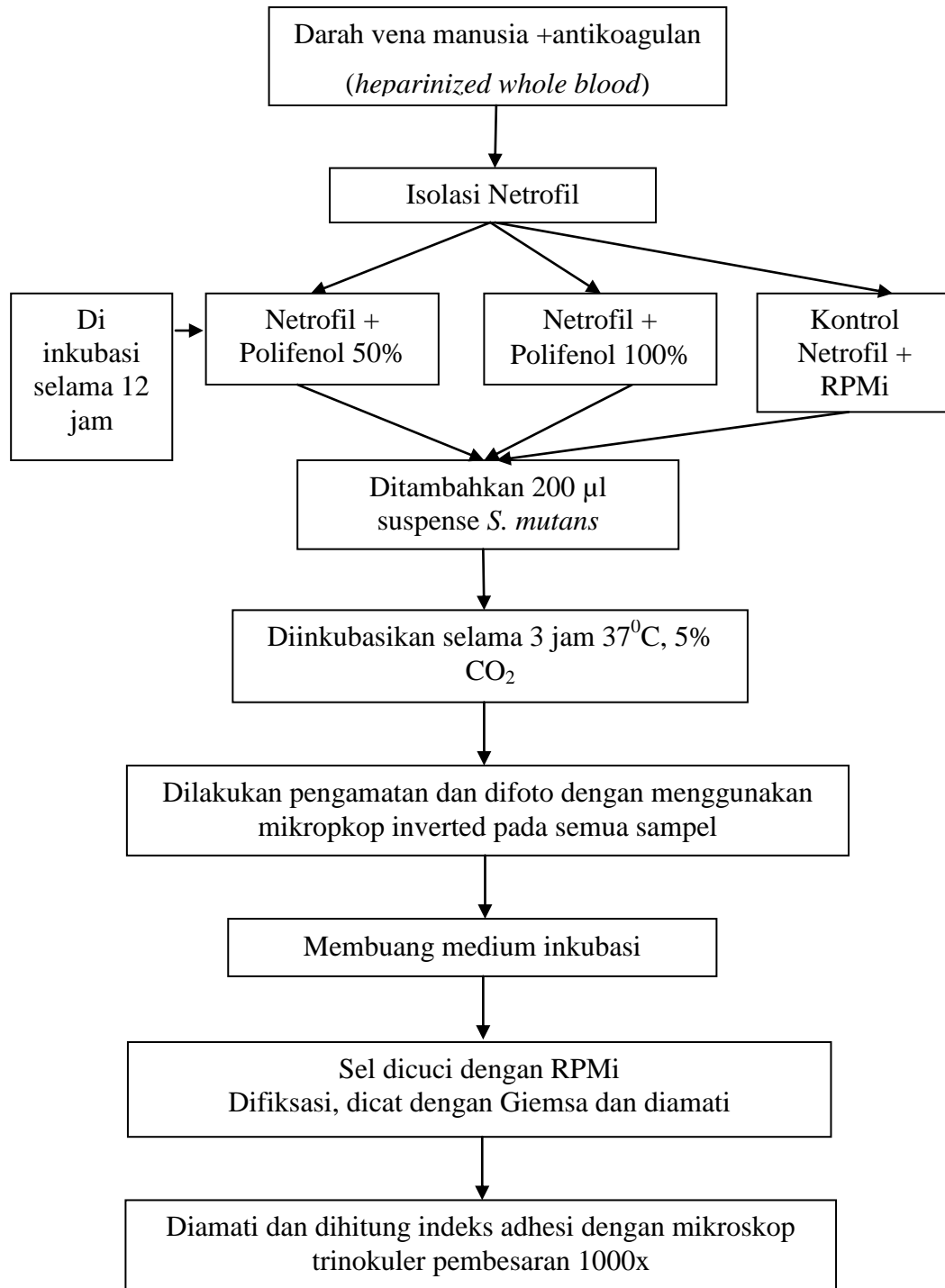
b. Perhitungan Indeks Adhesi

- 1) Melakukan perhitungan dengan cara menghitung jumlah bakteri yang menempel per 100 sel netrofil, dengan dua kali pengulangan, dan diambil rata-ratanya berturut-turut mulai dari konsentrasi 50%, 100% dan pada kelompok kontrol.
- 2) Kemudian dipilih 75 sel tiap kelompok perlakuan untuk dilakukan uji analisis data dengan menggunakan acuan data yang paling sering muncul (modus).

3.8 Analisis Data

Data hasil penelitian ditabulasi dan dilakukan uji parametrik *One Way ANOVA* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok, kemudian dilakukan dengan uji *LSD* untuk mengetahui besarnya perbedaan antar kelompok. Semua uji data dilakukan dengan menggunakan tingkat kemaknaan/ signifikansi 95% ($\alpha=0,05$).

3.9 Alur Penelitian

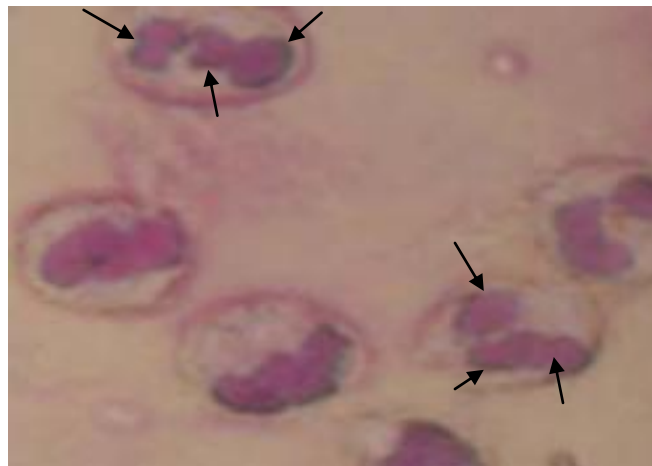


BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Penelitian

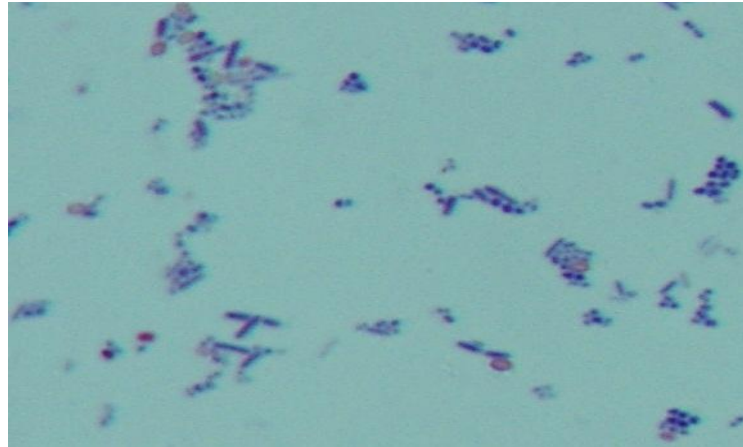
4.1.1. Data Penelitian

Setelah dilakukan isolasi netrofil didapatkan hasil sel netrofil yang tidak tercampur dengan sel darah lainnya. Dilakukan pengecekan dibawah mikroskop untuk mengetahui gambaran mikroskopis hasil isolasi sel netrofil dilakukan dengan pengecatan giemsa (Gambar 4.1).



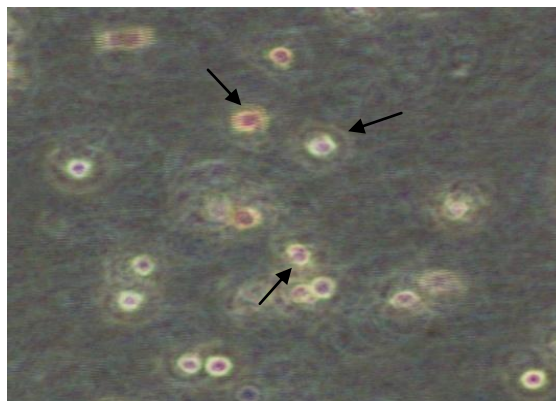
Gambar 4.1 Preparat hasil isolasi netrofil. Menunjukkan netrofil yang berwarna pink keunguan (Pengecatan Giemza, pembesaran 1000x), tampak bentukan polimorfonuklear, yaitu nukleus yang memiliki lobus-lobus (tanda panah), terdiri dari 3-5 lobus.

Preparasi *S. mutans* dilakukan untuk mengatur kekeruhan 0,5 McFarland dari *S. mutans* stok yang didapat kemudian diencerkan dengan aquadest dan dicek kekeruhannya menggunakan densicheck. Dilihat dibawah mikroskop setelah dilakukan pengecatan gram dan tampak *S. mutans* yang berbentuk bulat dan membentuk pasangan atau berantai (Gambar 4.2).



Gambar 4.2 Sediaan *S.mutans* terlihat berwarna ungu pada pemeriksaan mikroskopik sesuai sifat bakteri, gram positif berbentuk bulat membentuk pasangan atau rantai(Pengecatan Gram,pembesaran 1000x).

Uji viabilitas pada sel netrofil yang diberikan ekstrak polifenol biji kakao diuji dengan *trypan blue* dan dilakukan sebelum pengujian indeks adhesi. Tujuan dari uji viabilitas untuk mengetahui apakah sel netrofil viabel setelah diberikan ekstrak polifenol biji kakao, hal ini dikarenakan pada penelitian pendahulu mengalami kegagalan dengan kematian sel netrofil dan diduga ekstrak polifenol tidak viabel terhadap sel netrofil. Hasil menunjukkan bahwa sel netrofil viabel terhadap ekstrak polifenol biji kakao, kegagalan pada penelitian pendahulu dikarenakan waktu inkubasi yang terlalu lama. Hal ini ditunjukkan dengan gambaran mikroskopis sel-sel netrofil yang masih hidup dan utuh (Gambar 4.3).



Gambar 4.3 Hasil uji viabilitas netrofil. Tampak netrofil yang viabel (tanda panah) yang diinkubasi ekstrak polifenol biji kakao.

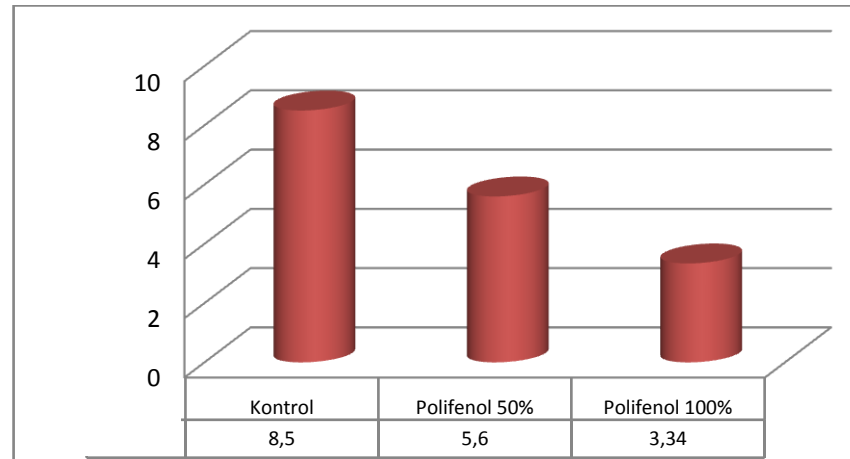
Hasil penelitian uji indeks adhesi yang telah dilakukan untuk mengetahui apakah ada pengaruh daya adhesi *S. mutans* pada netrofil yang diinkubasi ekstrak polifenol biji kakao pada konsentrasi 50% dan 100% yang dilaksanakan di Laboratorium *Bioscience* Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember didapatkan pencatatan rata-rata hasil pengukuran dapat dilihat pada (Tabel 4.1).

Tabel 4.1 Rata-rata hasil penghitungan adhesi *S. mutans* pada sel netrofil yang diinkubasi ekstrak polifenol biji kakao

| Kelompok | Indeks Adhesi | Std. Deviasi |
|----------------|---------------|--------------|
| Kontrol (RPMi) | 8,5 | ± 0,93 |
| Polifenol 50% | 5,6 | ± 0,65 |
| Polifenol 100% | 3,34 | ± 0,93 |

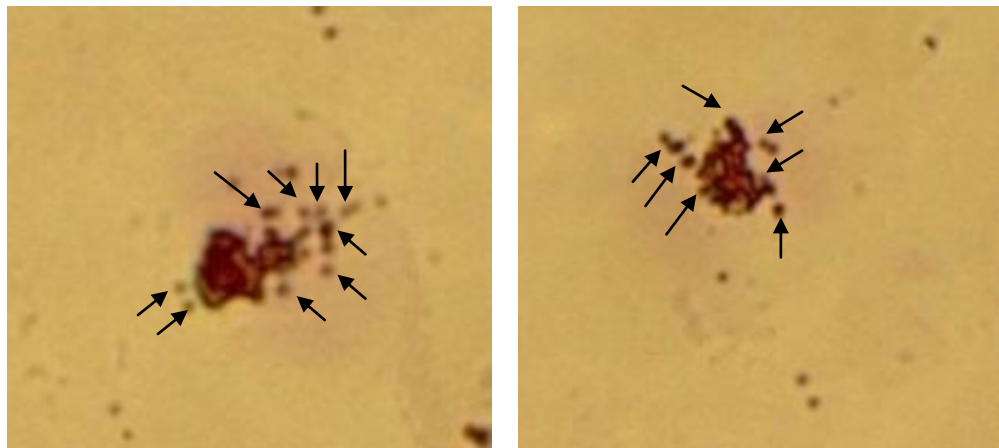
Berdasarkan tabel diatas dapat diketahui bahwa indeks adhesi *S. mutans* dan sel radang netrofil pada kelompok kontrol memiliki rata-rata yang paling tinggi yaitu 8,5 kemudian pada kelompok yang diberi ekstrak polifenol 50% memiliki rata-rata 5,6 yang artinya memiliki rata-rata lebih kecil dibandingkan pada kelompok kontrol. Kelompok yang diberi ekstrak polifenol 100% memiliki rata-rata paling rendah diantara dua kelompok lainnya yaitu 3,34.

Data hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan rata-rata daya adhesi *S. mutans* pada netrofil di tiap kelompok perlakuan menunjukkan bahwa ekstrak polifenol biji kakao sebagai antiinflamasi dapat menurunkan daya adhesi *S. mutans* pada netrofil. Tabel histogram rata-rata hasil penelitian (Gambar 4.4).

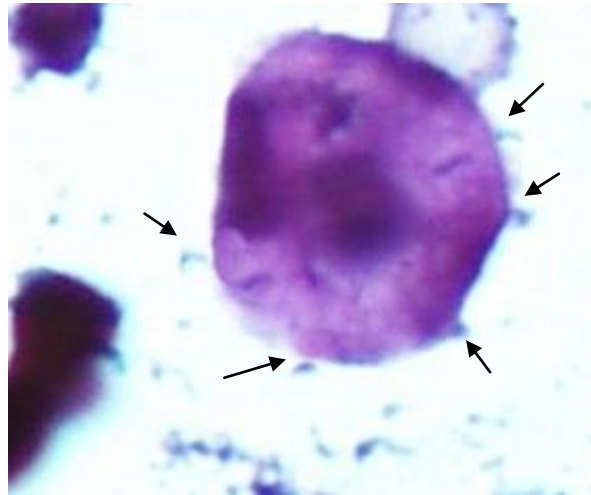


Gambar 4.4 Histogram rata-rata adhesi *S. mutans* pada sel netrofil pada tiap kelompok, kelompok kontrol diberikan 50 μ L RPMI, kelompok polifenol 50% diberikan 50 μ L ekstrak polifenol 50%, kelompok polifenol 100% diberikan 50 μ L ekstrak polifenol 100%.

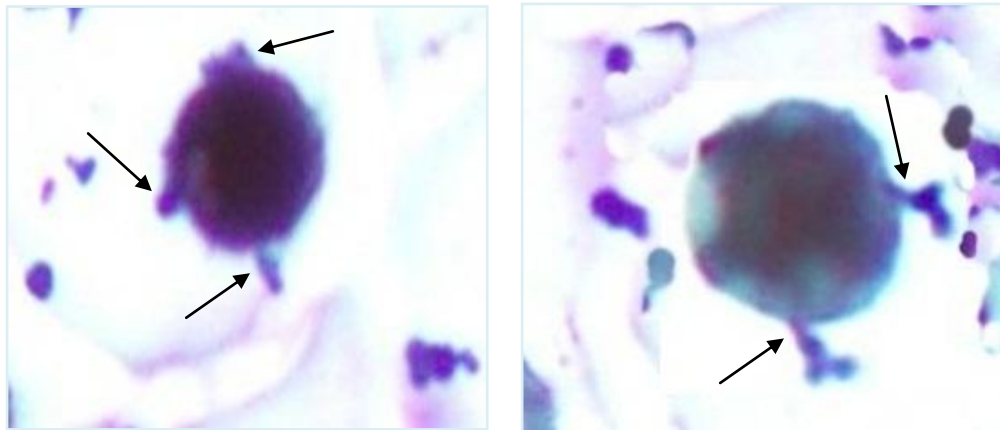
Gambaran mikroskopis ketiga kelompok, kelompok kontrol (Gambar 4.5), kelompok yang diberi ekstrak polifenol 50% (Gambar 4.6) dan kelompok yang diberi ekstrak polifenol 100% (Gambar 4.7):



Gambar 4.5 Gambaran mikroskopis adhesi *S. mutans* pada sel netrofil yangdiberikan RPMI (kelompok kontrol) menunjukkan adhesi *S.mutans* (tanda panah) dalam jumlah 7-12 bakteri/sel, banyaknya *S.mutans* yang melekat menyebabkan netrofil lisis dan membran sel pecah terjadi pengeluran cairan intraseluler (Pengecatan Giemza, pembesaran 1000x).



Gambar 4.6 Gambaran mikroskopis adhesi *S. mutans* pada sel netrofil yang diinkubasi ekstrak polifenol 50% tampak adhesi *S. mutans* (tanda panah) lebih sedikit dengan rata-rata 4-7 bakteri/sel (Pengecatan Giemza, pembesaran 1000x)



Gambar 4.7 Gambaran mikroskopis adhesi *S. mutans* pada sel netrofil yang diinkubasi ekstrak polifenol 100% tampak adhesi *S. mutans* (tanda panah) dengan rata-rata 2-5 bakteri/sel (Pengecatan Giemza, pembesaran 1000x)

4.1.2. Analisis Data

Data hasil penelitian diuji dengan uji normalitas dan uji homogenitas. Uji normalitas data dilakukan dengan menggunakan uji *Kolmogorov-smirnov* yang

bertujuan untuk melihat apakah data yang diperoleh melalui penelitian ini berdistribusi normal atau tidak.

Hasil dari uji normalitas data yang telah dilakukan menunjukkan bahwa data yang didapat dari hasil penelitian ini yaitu 0,063 yang berarti memiliki nilai $p > 0,05$, hal ini menunjukkan bahwa data hasil penelitian ini berdistribusi normal.

Uji yang dilakukan setelahnya ialah uji homogenitas data menggunakan uji *Levene test* dengan $p > 0,05$. Berdasarkan uji *Levene test* yang telah dilakukan, dapat diketahui bahwa nilai signifikansinya sebesar 0,058 ($p > 0,05$), hal ini membuktikan bahwa data yang didapat dari penelitian tersebut adalah homogen.

Data yang berdistribusi normal dan homogen telah memenuhi syarat untuk diuji secara parametrik menggunakan uji *One Way ANOVA*. Uji beda ini digunakan untuk mengetahui apakah ada perbedaan yang signifikan pada tiap kelompok perlakuan (Tabel 4.4). Uji *One Way ANOVA* ini digunakan untuk mengetahui apakah ada suatu perbedaan yang signifikan antara masing-masing variabel yang telah diteliti. Tingkat kemaknaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 95% ($p < 0,05$).

Hasil uji *One Way ANOVA* ialah 0,000, sehingga dapat diketahui bahwa hasil signifikansi data antar kelompok memiliki $p < 0,05$ yang menunjukkan ada beda yang signifikan pada penelitian ini. Pada data yang menunjukkan ada beda pada uji *One Way ANOVA* dilanjutkan uji *LSD* untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok. Terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok yang diberi ekstrak polifenol 50% dan 100% (Tabel 4.2).

Tabel 4.2 Perbandingan adhesi *S.mutans* pada netrofil antara masing-masing kelompok

| Kelompok | Adhesi <i>S.mutans</i> pada netrofil ($\bar{x} + SD$) | | |
|----------------|---|---------------|---------------|
| Kontrol (RPMi) | 8,5 ± 0,93 | 8,5 ± 0,93 | - |
| Polifenol 50% | 5,6 ± 0,65 | - | 5,6 ± 0,65 |
| Polifenol 100% | - | 3,34 ± 0,93 | 3,34 ± 0,93 |
| | $p = 0,000^*$ | $p = 0,000^*$ | $p = 0,000^*$ |

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

Hasil dari uji *LSD* pada masing-masing kelompok yang dibandingkan ialah 0,000. Data dikatakan memiliki perbedaan yang signifikan pada masing-masing

kelompok apabila $p < 0,05$, yang berarti bahwa hasil penelitian yang telah dilakukan tersebut memiliki perbedaan yang bermakna antara masing-masing kelompok.

Perbedaan yang bermakna pada uji beda yang dilakukan pada kelompok kontrol sebagai pembanding dan pada kelompok yang diberi perlakuan menunjukkan bahwa terdapat pengaruh dengan penurunan daya adhesi *S. mutans* pada netrofil yang diinkubasi dengan menggunakan ekstrak polifenol biji kakao.

4.2. Pembahasan

Pada penelitian indeks adhesi *S. mutans* pada netrofil yang telah diinkubasi ekstrak polifenol biji kakao didapatkan keseluruhan jumlah data sebanyak 600 sel netrofil yang dilakukan penghitungan. Namun, pada analisis data sebanyak digunakan sebanyak 450 sel yaitu 75% dari total sel. Hal ini bertujuan untuk mendapatkan kualitas data yang memadai (*quality control*) pada saat dilakukan analisis data. Dengan rincian pada kelompok kontrol diseleksi sebanyak 150 sel, pada kelompok polifenol 50% diseleksi sebanyak 150 sel dan pada kelompok polifenol 100% diseleksi sebanyak 150 sel.

Setiap kelompok yang akan dianalisis dilakukan seleksi data berdasarkan modus (frekuensi data yang sering muncul). Pada kelompok kontrol modus atau data yang paling sering muncul yaitu 7-12 bakteri/sel, pada kelompok yang diberikan ekstrak polifenol 50% yaitu 4-7 bakteri/sel dan pada kelompok yang diberikan polifenol 100% yaitu 2-5 bakteri/sel. Setelah diketahui modus tiap-tiap kelompok perlakuan maka diseleksi setiap kelompoknya hingga didapatkan data sebanyak 150 sel per kelompok untuk selanjutnya dilakukan analisis data.

Hasil pada analisis data yang telah dilakukan menunjukkan adanya pengaruh dengan penurunan daya adhesi *S. mutans* pada netrofil setelah diinkubasi ekstrak polifenol biji kakao. Kelompok kontrol yang tidak diberi ekstrak memiliki daya adhesi lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok yang diberi ekstrak polifenol biji kakao. Kelompok yang diberi ekstrak polifenol biji kakao konsentrasi 100% memiliki

pengaruh paling tinggi dalam penurunan daya adhesi *S. mutans* pada sel netrofil dibandingkan kelompok yang diberi ekstrak polifenol biji kakao konsentrasi 50%.

Pada kelompok kontrol, adhesi *S. mutans* pada sel netrofil tinggi sehingga mengakibatkan sel netrofil mengalami lisis dan dapat terjadi pengeluaran cairan intraselular. Hal ini ini dikarenakan sel netrofil hanya mampu memfagositosis 3-20 bakteri kemudian sel netrofil akan menjadi inaktif dan lisis.

Kelompok yang diberi ekstrak polifenol biji kakao konsentrasi 50% dan 100% menunjukkan hasil yang berbeda pada sel netrofil yang masih utuh dan mengalami penurunan daya adhesi sel netrofil yang dipapar *S. mutans*. Pada kelompok yang diberikan ekstrak polifenol biji kakao pada konsentrasi 50% sel-sel radang netrofil akan mengalami pembesaran sampai dengan dua kali pada ukuran normal yaitu diameter 7-9 μm dan dalam hapusan darah kering 10-12 μm .

Sel netrofil akan merespon adanya bakteri *S. mutans* yang masuk karena sel netrofil aktif pada awal reaksi inflamasi yang diawali dengan proses pelekatan. Proses pelekatan ini terjadi karena adanya interaksi antara komponen permukaan bakteri dan sel inang. Proses adhesi dapat dibedakan dalam dua bentuk, yaitu bersifat spesifik dan stabil (*irreversible*) serta adhesi yang tidak spesifik dan labil (*reversible*). Struktur yang bertanggungjawab terhadap sifat adhesi pada bakteri antara lain adhesin fimbriae, asam lipoteikoat atau protein adhesin. Struktur dari permukaan bakteri yang bersifat hidrofobik sangat berperan dalam proses pelekatan dengan sel inangnya (Baratawidjaja, 1996).

Adhesi yang tidak spesifik dan labil (*reversible*) yaitu melalui interaksi hidrofobik diantara sel bakteri dan sel fagosit. Sifat hidrofobisitas permukaan sel bakteri sangat dipengaruhi oleh banyaknya protein permukaan. Kaitan antara sifat hidrofobisitas dan pelekatan telah diamati pada bakteri *Streptococcus suis* terhadap eritrosit dan sel HeLa, diketahui bahwa semakin hidrofobik permukaan sel bakteri, semakin tinggi kemampuan melekatnya pada sel inang. Permukaan sel hidrofobik, dibandingkan dengan sel hidrofilik menunjukkan bahwa pada permukaan sel

hidrofobik terjadi perlekatan yang lebih besar pada epitel, sel endotel, dan protein matriks seluler. Permukaan sel hidrofobik ini akan menjadi lebih resisten terhadap sel fagosit (Wibawan dan Lammer, 1993).

Adhesi yang bersifat spesifik dan stabil (*irreversible*) yaitu dengan proses opsonisasi, dimana opsonin yang mengikat bakteri/antigen mudah melekat bila bakteri mengaktifkan komplemen C3b. Pada bakteri yang tidak mengaktifkan komplemen C3b dapat mengadakan perlekatan dengan sel fagosit dengan bantuan antibodi (Ab) yang berfungsi sebagai jembatan yang mengikatkan bakteri dengan reseptor Fc yang diaktifkan pada membran sel netrofil (Baratawidjaja, 1996).

Mikroorganisme berperan penting dalam terjadinya penyakit pulpa gigi, salah satu yang paling berperan yaitu bakteri *S. mutans*. Bakteri *S. mutans* mampu mendemineralisasikan enamel dan dentin dan masuk ke dalam pulpa menyebabkan terjadinya inflamasi pada pulpa. Bakteri dapat masuk ke dalam pulpa dapat melalui tubuli dentin yang sudah terbuka, baik dari karies maupun terbukanya pulpa karena trauma, adanya kebocoran pada restorasi, dari perluasan infeksi pada gingiva atau melalui peredaran darah (Grossman, 2005).

Bakteri yang masuk ke dalam pulpa gigi akan langsung direspon tubuh dengan inflamasi dan berkumpulnya sel-sel radang pada daerah tersebut, terutama sel netrofil. Pada kondisi klinis penyakit pulpa diklasifikasikan menjadi: (1) pulpitis reversibel, terjadi inflamasi pulpa ditandai dengan gejala rasa sakit yang sebentar dan bila rangsangan dihilangkan maka rasa sakit juga akan hilang; (2) pulpitis ireversibel, inflamasi pulpa ditandai dengan gejala sakit yang timbul spontan dan tidak hilang bila rangsangan dihentikan; (3) nekrosis pulpa, merupakan kondisi dimana pulpa sudah mati dan ditandai dengan diskolorisasi gigi menjadi berwarna kecoklatan atau keabuan (Grossman, 2005).

Inflamasi dikatakan berlebihan bila sel-sel inflamasi yang mengatasi adanya antigen juga merusak jaringan sekitar yang normal. Sel radang netrofil hanya mampu memfagositosis bakteri 3-20 setelah itu akan lisis dan cairan intrasel keluar ke jaringan. Lisosom pada sel netrofil berisi enzim lisozim yang berfungsi sebagai

pencernaan antigen yang masuk. Lisosom memiliki membran yang mencegah enzim lisozim berkontak dengan zat lain di dalam sel dengan demikian mencegah kerja pencernaannya. Sel netrofil lisis menyebabkan membran pada lisosom juga pecah dan keluar ke jaringan normal, sehingga enzim lisozim mencerna atau merusak jaringan normal (Guyton dan Hall, 1997).

Polifenol biji kakao memiliki efek antiinflamasi karena polifenol bersifat hidrofilik sehingga mampu menurunkan hidrofobisitas pada permukaan bakteri dan sel fagosit sehingga menghambat adhesi bakteri dengan sel fagosit saat mengadakan adhesi melalui interaksi hidrofobik. Hal ini bertujuan agar jumlah bakteri yang difagosit dapat menurun dan mengurangi sel netrofil yang lisis. Berkurangnya sel netrofil yang lisis juga berdampak pada berkurangnya enzim lisozim yang keluar dari sel dan menyebabkan kerusakan jaringan.

Pada penelitian ini dibuktikan pada sel netrofil yang diberikan ekstrak polifenol biji kakao pada konsentrasi 50% dan 100% dan kemudian dipapar dengan *S. mutans* menunjukkan penurunan adhesi sehingga sel netrofil yang lisis menurun. Polifenol ekstrak biji kakao konsentrasi 100% lebih efektif untuk menurunkan adhesi sel netrofil pada *S. mutans* dibandingkan pada konsentrasi 50%. Keefektifan polifenol ekstrak biji kakao yang dalam menurunkan adhesi netrofil yang dipapar *S. mutans*, menunjukkan bahwa polifenolekstrak biji kakao efektif sebagai antiinflamasi dan mampu membatasi kerusakan jaringan pada pulpa gigi akibat adanya bakteri *S. mutans* yang menginvasi ke dalam pulpa gigi.

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan maka dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

- a. Polifenol ekstrak biji kakao berpengaruh menurunkan daya adhesi *S. mutans* pada sel netrofil.
- b. Polifenol ekstrak biji kakao dengan konsentrasi 100% secara signifikan lebih efektif dalam menurunkan adhesi *S. mutans* pada sel netrofil dibandingkan dengan konsentrasi 50%.

5.2 Saran

- a. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pengaruh daya adhesi *S. mutans* pada netrofil yang diinkubasi ekstrak polifenol biji kakao pada konsentrasi lainnya.
- b. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui penyebab adanya pembesaran sel netrofil yang diberikan ekstrak polifenol biji kakao pada konsentrasi 50%.
- c. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk melakukan pemberian atau intervensi bahan lain yang berpengaruh pada penurunan daya adhesi *S. mutans* pada sel netrofil.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., Maitra. A. 2005. *Pathologic Basis of Disease Edisi ke-7 The endocrine system*. Philadelphia: Elsevier Saunders
- Anusavice, K.J. 2004. *Buku Ajar Ilmu Bahan Kedokteran Gigi*. Jakarta: EGC.
- Baratawidjaja, K.G. 1996. *Imunologi Dasar: Edisi Ketiga*. Jakarta: Balai Penerbit FKUI.
- Bellanti, J.A. 1993. *Immunologi III*. Yogyakarta: Gadjahmada University Press.
- Capuccino., James. G., Natalie, S. 2001. *Microbiology : A Laboratory Manual, Sixth Edition*. San Fransisico: Benjamin Cummings.
- Christensen, G.D., Beachey, E.H. 1984. *The Molecular Basis For The Localization of Bacterial Infections*. Adv Intern Medicine.
- Cruse, J.M., Lewis, R.E. 2004. *Types I, II, III, and IV hypersensitivity*. In : *Atlas of Immunology. Second Edition* . CRC: Press LLC
- Daniswara, Nanda. 2008. *Perbandingan Efektivitas Air Perasan Buah Nanas (Ananas comosus (L.) Merr) 100%, Zinc Pyrithione 1% dan Ketokonazol 1 % Secara In Vitro Terhadap Pertumbuhan Pityrosporum ovale*. Skripsi. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Doyle, Rosenberg. 1990. *Microbial Cell Surface Hidrophobicity*. New York: Soc Microbial.
- Eales, L.J. 1997. *Immunology for Life Scientist: A Basic Introduction*. New York: John Wiley and Sons.
- Ed, dan F Man. 2004. *Cocoa Report Market No. 371: March 2004*. Ed dan F ManLtd.
- Fankhauser, D. B. 2002. *Histologi of Circulatory System*. [online]. http://biology.clc.uc.edu/fankhauser/Labs/Anatomy_&Physiology/A&P203/Circulatory_System/Circulatory_Sys_Histology.htm. [8 Februari 2012].


- Ferencik, M. 1993. *Handbook of Immunochemistry: First Edition*. London: Chapman and Hall.
- Fessenden, R.J., and Fessenden, J.S. 1982. *Kimia Organik jilid 2*. Jakarta : Erlangga.
- Firman, Bob. 2007. *Perbandingan Pengaruh Sevofluran dan Isofluran Terhadap Jumlah Netrofil Polimorfonuklear Darah Tepi*. Tidak Dipublikasikan. Tesis. Semarang: Program Pasca Sarjana Magister Ilmu Biomedik dan Pendidikan Dokter Spesialis Anestesiologi Universitas Diponegoro.
- Grossman, Oriet, dan Rio. 1995. *Ilmu Endodontik Dalam Praktek. Edisi kesebelas*. Alih bahasa: Rafiah Abyono. Jakarta: EGC.
- Guyton, A.C., dan Hall, J.E. 2008. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran: Edisi 11*. Jakarta: EGC.
- Hamsari, Evan. 2010. *Teh Dapat Menghambat Pembentukan Karies Gigi*. <http://www.infogigi.com/kesehatan-gigi/teh-dapat-menghambat-pembentukan-karies-gigi.html>. [1 Juni 2011]
- Harho, Guntur. 2010. *Memperkenalkan Tanaman Kakako/Coklat Pada Masyarakat Pojok/Plawon Gunturharjo*. <http://gunturharjogo.wordpress.com/2010/04/09/memperkenalkan-tanaman-kakaocoklat-pada-masyarakat-pojokplawon-gunturharjo>. [14 Januari 2012].
- Harmawan, S. 2010. *Pemanfaatan Ekstrak Polifenol Biji Kakao (Theobroma cacao L.) Kering Nonfermented Terserang Conopormorpha cramerella snellen dan Phytophthora palmivora butler Sebagai Antibakteri*. Skripsi. Jember: Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember
- Heriandi, S. 1992. *The Determination of The Predictive Value of Caries Activity Test Cariostat: 13th*. Dipublikasikan. Kongres. Kyoto: Congress of International Association of Dentistry for Children.
- Jawetz, Melnick dan Adelberg.2005. *Mikrobiologi Kedokteran*.Jakarta:EGC
- Juncqueira, C., Carneiro, J. O., Kelly, R.1997. *Histologi Dasar. Edisi ke 8*. Jakarta :EGC.
- Katzung, B.G.2001. *Farmakologi Dasar dan Klinik*. Jakarta : Salemba Medika.
- Kee, J.L., Hayes, E.R. 1996. *Farmakologi Pendekatan Proses Keperawatan*. Jakarta: EGC.

- Leeson, C.R., Paparo, A.A. 1996. *Atlas Histologi. Edisi 5*. Jakarta: EGC.
- Lehner, T. 1992. *Immunology of Oral Disease. Ed.3*. Oxford : Blackwell sci.
- 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).
- Murphy, K.J. *et al.*, 2003. *Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (Theobroma cacao) inhibit platelet function* : Am J Clin Nutr
- Narayana, K.R., Reddy, M.R., Chaluvadi, M.R. 2001. *Bioflavonoids Classifications Pharmacological, Biochemical Effects and Therapeutic Potential*. Dipublikasikan. Indian Journal Pharmacology. Warangal: Drug Metabolism & Clin. Pharmacokinetics Division, University College of Pharmaceutical Sciences, Kakatiya University.
- Noer HMS, Waspadji, Rachman AM, et al S. 1996. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam 3rd ed*. Jakarta: Balai Penerbit FKUI.
- Nolte, W.A. 1982. *Oral Microbiology With Basic Microbiology and Immunology: 4th Edition*. Saint Louis: Mosby.
- Notoatmodjo, Soekidjo. 2005. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta : PT. Rineka Cipta
- Nugraha, A.W. 2008. *Streptococcus mutans, Si Plak Dimana-mana*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma Yogyakarta.
- Olson, J .2003. *Belajar Mudah Farmakologi*. Jakarta : Penerbit buku kedokteran.
- Pratama, M.R. 2005. *Pengaruh Ekstrak Serbuk Kayu Siwak (Salvadora Persica) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Streptococcus mutans Dan Staphylococcus aureus Dengan Metode Difusi Agar*. Skripsi. Surabaya: Progam Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Price, S., Wilson L. 1994. *Patofisiologi: konsep klinis proses-prose penyakit*. edisi: 4. Jakarta :EGC.

- Robbins, S.L., dan Kumar, V. 1995. *Buku Ajar Patologi I: Edisi Keempat*. Jakarta: EGC.
- Roitt, I.M. 1991. *Essensial Immunology*. London: Blackwell Sci Publ.
- Sabir, Ardo.2003. *Pemanfaatan Flavanoid di Bidang Kedokteran Gigi*. Maj.KG *Dental Journal Edisi Khusus Temu Ilmiah Nasional III*. Surabaya :Airlangga University Pers. Vol.38:135-141.
- Santosaningih, Dewi. 2004. *Peranan Protein Fimbriae dan Lipopolisakarida Terhadap Perlekatan Bakteri Enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) 0157 Pada Enterosit Kelinci Secara Invitro*. Skripsi. Surabaya: Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
- Sherwood, L. 2001. *Fisiologi Manusia : Dari Sel ke Sistem*. Jakarta: EGC
- Siregar, T. 2005. *Budidaya, Pengolahan dan Pemasaran Cokelat*. Jakarta: Penebar Swadaya
- Sunanto, H.1992. *Cokelat : Budidaya, Pengolahan Hasil dan Aspek Ekonomisnya*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius
- Susanto, F. X. 1994. *Tanaman Kakao*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Vandepitte, J., Engback, K., Piot, P., Heuck, C.C. 1991. *Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology*. Geneva: WHO Library
- Wahyudi.2007. *Adhesi dan Aktivitas Fagositosis Sel Polimorfonuklear Terhadap Staphylococcus Aureus Asal Susu Sapi Perah dan Manusia Yang Bersifat Multiresisten Terhadap Antibiotik*. [online]. <http://yudhiekh.web.ugm.ac.id/?p=7> [27 April 2011]
- Watson, R. 2002. *Anatomy and Physiology for Nurses 11th*. London: Bailliere Tindall
- Weisburger, J.H. 2001 *Chemopreventive Effects of Cocoa Polyphenols on Chronic Diseases*. Journal. :Experimental Biology and Medicine. New Jersey: Maywood.
- Wibawan, W. T., Ch. LÃmmler, R. S. Seleim and F. H. Pasaribu. 1993. *A hemagglutinating adhesin of group B Streptococci isolated from cases of bovine mastitis mediates an adherence to HeLa cells*. J. Gen. Microbiol. 139

- Wilmana, P. F. 1995. *Analgesik, Antipiretik, Antiinflamasi dan Antipirai Farmakologi dan Terapi* (edisi 3). Journal. Jakarta: Bagian Farmakologi Kedokteran Universitas Indonesia
- 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.

Lampiran A. Surat Ijin Penelitian



KEMENTERIAN PENDIDIKAN NASIONAL RI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
Jl. Kalimantan No. 37 Jember ☎(0331) 333536, Fak. 331991

Nomor : *013* /H25.1.8/PL.5/2011
Lampiran : -
Perihal : Ijin Penelitian


Kepada Yth.
Ka. Bag.BIOMEDIK FKG Universitas Jember
c.q PJMK. Mikrobiologi FKG Universitas Jember
di
Jember

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


| | |
|--------------------------|---|
| 1. Nama | : Novema Yolanda Intan R |
| 2. NIM | : 081610101095 |
| 3. Tahun Akademik | : 2010/2011 |
| 4. Fakultas | : Kedokteran Gigi Universitas Jember |
| 5. Alamat | : Jl. Riau No. 18 A Jember |
| 6. Judul Penelitian | : Daya Adhesi Streptococcus Mutans Pada Neotrofil Yang Diinkubasi Ekstrak Polifenol Biji Kakao (Theobroma Cacao L) |
| 7. Lokasi Penelitian | : Lab. Mikrobiologi FKG UNEJ |
| 8. Data/Alat yg dipinjam | : Alat laboratorium dan ruangan laboratorium |
| 9. Waktu | : Juli 2011 s/d selesai |
| 10. Tujuan Penelitian | : Untuk Mengetahui Daya Adhesi Streptococcus Mutans Pada Neotrofil Yang Diinkubasi Ekstrak Polifenol Biji Kakao (Theobroma Cacao L) |
| 11. Dosen Pembimbing | : 1. Dr. drg. Purwanto, M.Kes 2. drg. Dessy Sandra S, MD.Sc |

Demikian atas perkenan dan kerjasama yang baik disampaikan terima kasih.

Jember, 25 Juli 2011
an. Dekan
Pembantu Dekan I



drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes, Sp.Prost
NIP. 1969011219996011001



Tembusan Kepada Yth.
- PJMK Mikrobiologi FKG Universitas Jember

Lampiran B. Data Hasil Penelitian

Tabel .1 Data hasil penelitian daya adhesi *S.mutans* pada satu sel netrofil tiap kelompok sampel

| Sel netrofil | Kontrol | | Polifenol 50% | | Polifenol 100% | |
|--------------|---------|----|---------------|---|----------------|---|
| | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| 1 | 8 | 10 | 7 | 4 | 2 | 3 |
| 2 | 9 | 7 | 7 | 6 | 3 | 4 |
| 3 | 8 | 7 | 7 | 7 | 4 | 3 |
| 4 | 9 | 7 | 4 | 6 | 3 | 3 |
| 5 | 7 | 7 | 5 | 4 | 4 | 4 |
| 6 | 9 | 7 | 6 | 4 | 5 | 5 |
| 7 | 8 | 9 | 7 | 7 | 2 | 2 |
| 8 | 10 | 7 | 5 | 6 | 3 | 2 |
| 9 | 11 | 8 | 4 | 6 | 4 | 3 |
| 10 | 9 | 9 | 4 | 5 | 2 | 2 |
| 11 | 9 | 9 | 4 | 6 | 5 | 5 |
| 12 | 9 | 7 | 4 | 7 | 4 | 3 |
| 13 | 7 | 7 | 5 | 6 | 5 | 5 |
| 14 | 8 | 8 | 5 | 5 | 4 | 3 |
| 15 | 8 | 7 | 4 | 4 | 4 | 5 |
| 16 | 9 | 8 | 5 | 6 | 4 | 3 |
| 17 | 11 | 7 | 4 | 4 | 5 | 5 |
| 18 | 6 | 9 | 5 | 5 | 4 | 4 |
| 19 | 8 | 7 | 4 | 4 | 3 | 4 |
| 20 | 10 | 9 | 6 | 6 | 3 | 2 |
| 21 | 8 | 8 | 6 | 6 | 4 | 3 |
| 22 | 8 | 8 | 4 | 6 | 4 | 5 |
| 23 | 8 | 11 | 6 | 6 | 3 | 4 |
| 24 | 8 | 7 | 5 | 6 | 3 | 5 |
| 25 | 7 | 7 | 7 | 7 | 2 | 3 |
| 26 | 11 | 8 | 7 | 8 | 3 | 3 |
| 27 | 8 | 7 | 6 | 6 | 3 | 2 |
| 28 | 8 | 8 | 6 | 7 | 4 | 4 |
| 29 | 11 | 9 | 4 | 5 | 2 | 2 |
| 30 | 8 | 10 | 6 | 6 | 5 | 5 |

| | | | | | | |
|----|----|----|---|---|---|---|
| 31 | 8 | 10 | 6 | 5 | 3 | 2 |
| 32 | 8 | 7 | 5 | 4 | 4 | 4 |
| 33 | 8 | 8 | 7 | 7 | 4 | 4 |
| 34 | 11 | 9 | 4 | 7 | 3 | 3 |
| 35 | 8 | 6 | 5 | 5 | 2 | 4 |
| 36 | 9 | 8 | 4 | 7 | 3 | 3 |
| 37 | 8 | 9 | 5 | 4 | 4 | 3 |
| 38 | 11 | 9 | 4 | 6 | 3 | 5 |
| 39 | 8 | 10 | 5 | 6 | 2 | 4 |
| 40 | 8 | 8 | 7 | 6 | 4 | 5 |
| 41 | 8 | 7 | 6 | 7 | 3 | 2 |
| 42 | 10 | 7 | 6 | 6 | 4 | 3 |
| 43 | 8 | 10 | 4 | 5 | 4 | 3 |
| 44 | 8 | 9 | 5 | 7 | 5 | 5 |
| 45 | 11 | 9 | 7 | 6 | 2 | 3 |
| 46 | 7 | 9 | 4 | 7 | 4 | 4 |
| 47 | 8 | 7 | 7 | 6 | 4 | 4 |
| 48 | 7 | 10 | 7 | 5 | 3 | 2 |
| 49 | 7 | 10 | 7 | 7 | 2 | 3 |
| 50 | 7 | 7 | 5 | 6 | 3 | 4 |
| 51 | 7 | 11 | 4 | 4 | 5 | 5 |
| 52 | 8 | 7 | 6 | 6 | 4 | 4 |
| 53 | 9 | 11 | 7 | 5 | 2 | 3 |
| 54 | 8 | 10 | 7 | 6 | 2 | 2 |
| 55 | 7 | 9 | 7 | 7 | 3 | 5 |
| 56 | 8 | 9 | 4 | 6 | 2 | 2 |
| 57 | 7 | 9 | 6 | 7 | 2 | 5 |
| 58 | 10 | 8 | 7 | 4 | 2 | 4 |
| 59 | 7 | 9 | 4 | 5 | 2 | 2 |
| 60 | 9 | 7 | 6 | 5 | 3 | 3 |
| 61 | 7 | 11 | 5 | 6 | 2 | 2 |
| 62 | 7 | 10 | 7 | 7 | 4 | 4 |
| 63 | 8 | 10 | 6 | 5 | 2 | 4 |
| 64 | 8 | 11 | 5 | 4 | 2 | 2 |
| 65 | 7 | 7 | 4 | 5 | 5 | 5 |
| 66 | 7 | 8 | 5 | 4 | 4 | 4 |
| 67 | 9 | 11 | 7 | 7 | 3 | 3 |
| 68 | 10 | 9 | 5 | 5 | 4 | 3 |
| 69 | 9 | 11 | 4 | 7 | 3 | 3 |

| | | | | | | |
|-----------------------|-------|-----|------|------|------|------|
| 70 | 7 | 10 | 7 | 6 | 4 | 3 |
| 71 | 7 | 11 | 6 | 6 | 2 | 3 |
| 72 | 8 | 9 | 5 | 6 | 2 | 2 |
| 73 | 10 | 10 | 6 | 5 | 2 | 2 |
| 74 | 11 | 11 | 7 | 5 | 4 | 3 |
| 75 | 10 | 8 | 6 | 7 | 3 | 5 |
| Rata-rata | 8,41 | 8,6 | 5,49 | 5,73 | 3,27 | 3,45 |
| Total Ratarata | 8,507 | | 5,6 | | 3,34 | |

Lampiran C. Analisis Data

C.1 Uji Normalitas Kolmogorov-Smirnov

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

| | | Jumlah Sel |
|--|-----------------------|----------------|
| N | | 450 |
| Normal Parameters^{a,b} | Mean | 5.9111 |
| | Std. Deviation | 2.34850 |
| Most Extreme Differences | Absolute | .145 |
| | Positive | .093 |
| | Negative | -.103 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | | 2.085 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | .063 |

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

C.2 Uji Homogenitas Levene

Test of Homogeneity of Variances

| Jumlah Sel | | | |
|------------------|-----|-----|------|
| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
| 16.699 | 2 | 447 | .058 |

C.3 Uji beda *one way ANOVA*

ANOVA

| Jumlah Sel | | | | | |
|----------------|----------------|-----|-------------|---------|------|
| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
| Between Groups | 1904.671 | 2 | 952.336 | 744.515 | .000 |
| Within Groups | 571.773 | 447 | 1.279 | | |
| Total | 2476.444 | 449 | | | |

Descriptives

Jumlah Sel

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|----------------|-----|--------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| Kontrol | 150 | 8.5800 | 1.34748 | .11002 | 8.3626 | 8.7974 | 6.00 | 11.00 |
| Polifenol 50% | 150 | 5.5800 | 1.10076 | .08988 | 5.4024 | 5.7576 | 4.00 | 7.00 |
| Polifenol 100% | 150 | 3.5733 | .90001 | .07349 | 3.4281 | 3.7185 | 2.00 | 5.00 |
| Total | 450 | 5.9111 | 2.34850 | .11071 | 5.6935 | 6.1287 | 2.00 | 11.00 |

C.4 Uji *LSD* (Least Significant Difference)

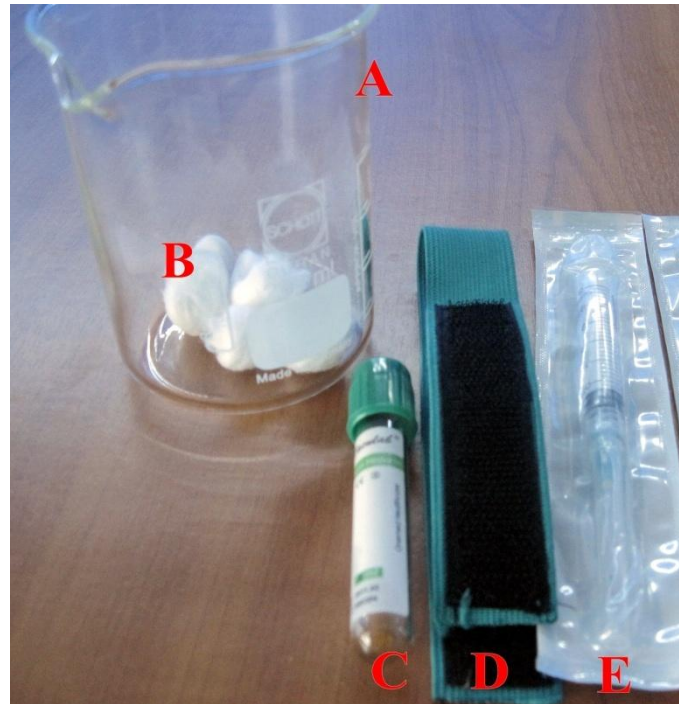
Multiple Comparisons

Dependent Variable: Jumlah Sel

| | (I) Perlakuan | (J) Perlakuan | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|-----|----------------|----------------|-----------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
| | | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| LSD | Kontrol | Polifenol 50% | 3.00000* | .13060 | .000 | 2.7433 | 3.2567 |
| | | Polifenol 100% | 5.00667* | .13060 | .000 | 4.7500 | 5.2633 |
| | Polifenol 50% | Kontrol | -3.00000* | .13060 | .000 | -3.2567 | -2.7433 |
| | | Polifenol 100% | 2.00667* | .13060 | .000 | 1.7500 | 2.2633 |
| | Polifenol 100% | Kontrol | -5.00667* | .13060 | .000 | -5.2633 | -4.7500 |
| | | Polifenol 50% | -2.00667* | .13060 | .000 | -2.2633 | -1.7500 |

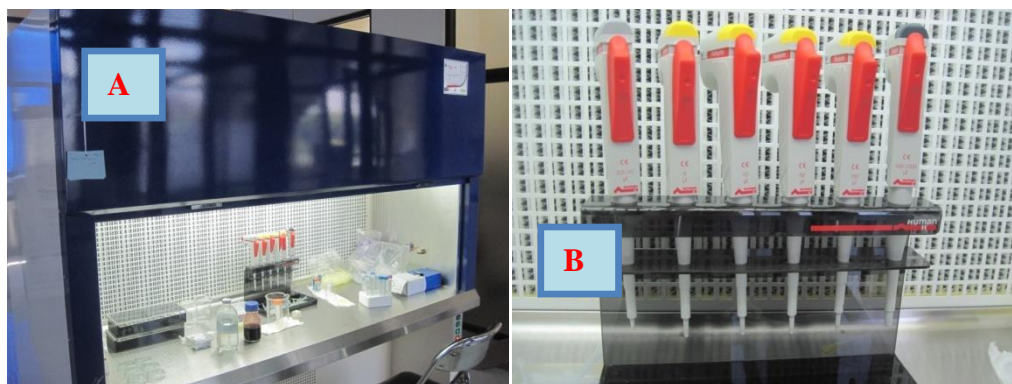
*. The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran D. Foto Alat Penelitian



A. Tabung reaksi; B. Kapas beralkohol; C. Tabung heparin; D. *Torniquet*; E. *Syringe* 5ml

Gambar D.1 Foto alat penelitian



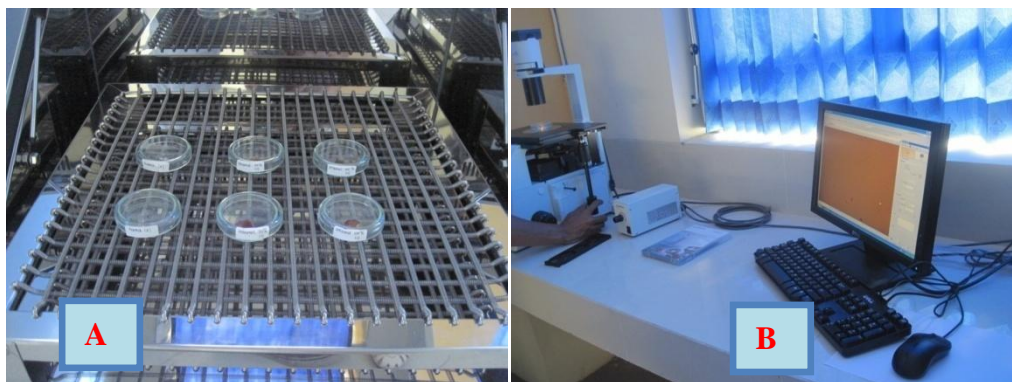
A. *Laminar flow*; B. Pipet mikro

Gambar D.2 Foto alat penelitian



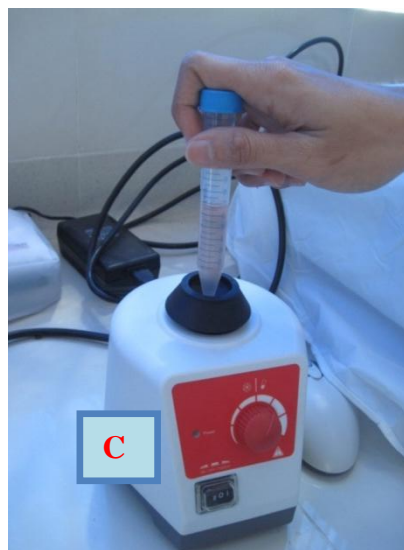
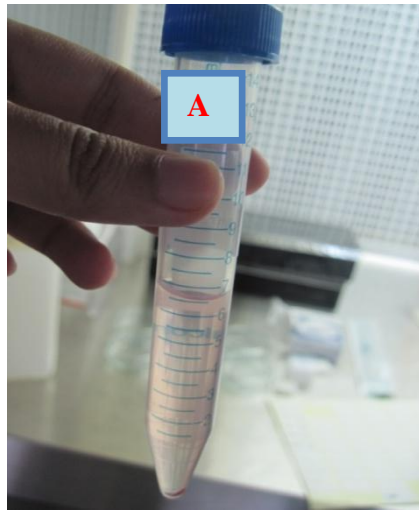
A. Centrifuge; B. Inkubator

Gambar D.3 Foto alat penelitian



A. Petridish kecil; B. Mikroskop inverted; C. Mikroskop trinokuler

Gambar D.4 Foto alat penelitian



A. Tabung falcon; B. Inkubator CO₂; C. Vortex; D. Densicheck

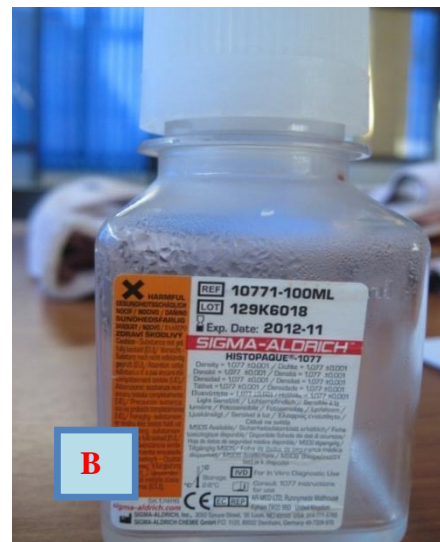
Gambar D.5 Foto alat penelitian

Lampiran E. Foto Bahan Penelitian



A. Ekstrak polifenol biji kakao; B. HBSS

Gambar E.1 Foto bahan penelitian



A. RPMi; B. *Ficoll Hypaque Gradient*

Gambar E.3 Foto bahan penelitian



Gambar E.5 Dextran 6%



Gambar E.6 Aquadest steril