



**Daya Hambat Ekstrak Proantosianidin Kulit Buah Kakao
(*Theobroma Cacao L.*) Terhadap *Streptococcus mutans* dan
Porphyromonas gingivalis Melalui Uji *Minimum Inhibition
Concentration***

SKRIPSI

Oleh

Ibnu Satria

NIM 151610101022

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS JEMBER

2019



**Daya Hambat Ekstrak Proantosianidin Kulit Buah Kakao
(*Theobroma Cacao L.*) Terhadap *Streptococcus mutans* dan
Porphyromonas gingivalis Melalui Uji *Minimum Inhibition
Concentration***

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk
meraih gelar sarjana Kedokteran Gigi (S1) pada Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Jember

Oleh

Ibnu Satria

151610101022

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS JEMBER

2019

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Allah SWT atas limpahan rahmat, hidayah, kemudahan dan berkah yang tiada habisnya;
2. Nabi Muhammad SAW;
3. Orang tua saya tercinta, Alm. Mohamad Thamrin, Ibu Wahyuni dan Bapak Pujiantoro yang selalu memberikan dukungan, do'a, dan semangat;
4. Adik saya tercinta Mikhayla Oktora Putri Antoro;
5. Guru-guruku sejak taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi, Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

MOTO

“Diwajibkan atas kamu berperang, padahal berperang itu adalah sesuatu yang kamu benci. Boleh jadi kamu membenci sesuatu, padahal ia amat baik bagimu, dan boleh jadi (pula) kamu menyukai sesuatu, padahal ia amat buruk bagimu; Allah mengetahui, sedang kamu tidak mengetahui”

(Q.S. Al-Baqarah:216)*

“Sesungguhnya Kami telah memberikan kepadamu nikmat yang banyak”

(Q.S. Al-Kautsar:1)*

"Maka nikmat Tuhan kamu yang manakah yang kamu dustakan"

(Q.S Ar-Rahman: 13)*

* Departemen Agama RI. 2011. Al-Quran dan Terjemahannya. Bandung: CV Penerbit Diponegoro

PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : Ibnu Satria

NIM : 151610101022

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Daya Hambat Ekstrak Proantosianidin Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*) Terhadap *Streptococcus mutans* dan *Porphyromonas gingivalis* Melalui Uji *Minimum Inhibition Concentration*” adalah benar-benar hasil karya saya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada instansi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang dijunjung tinggi.

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

Jember, 17 Mei 2019

Yang menyatakan

Ibnu Satria

NIM 151610101022

SKRIPSI

**Daya Hambat Ekstrak Proantosianidin Kulit Buah Kakao
(*Theobroma Cacao L.*) Terhadap *Streptococcus mutans* dan
Porphyromonas gingivalis Melalui Uji *Minimum Inhibition
Concentration***

Oleh

Ibnu Satria

NIM 151610101022

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : drg. Yani Corvianindya Rahayu, M.KG.

Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Pujiana Endah Lestari, M.Kes.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Uji Daya Hambat Ekstrak Proantosianidin Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*) Terhadap *Streptococcus mutans* dan *Porphyromonas gingivalis* Melalui Uji *Minimum Inhibition Concentration*” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi pada :

Hari, tanggal :

Tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Tim Penguji

Dosen Penguji Ketua

Dosen Penguji Anggota

Dr. drg. Atik Kurniawati, M.Kes

drg. Tantin Ermawati, M.Kes

NIP. 197102041998022002

NIP. 198003222008122003

Pembimbing

Dosen Pembimbing utama

Dosen Pembimbing Anggota

drg. Yani Corvianindya Rahayu, M.KG.

drg. Pujiana Endah Lestari, M.Kes.

NIP. 197308251998022001

NIP. 197608092005012002

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi

Universitas Jember

drg. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Prof

NIP. 196901121996011001

RINGKASAN

Uji Daya Hambat Ekstrak Proantosianidin Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*) Terhadap *Streptococcus mutans* dan *Porphyromonas gingivalis* Melalui Uji *Minimum Inhibition Concentration*; Ibnu Satria, 151610101022; 2019 : 70 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Karies gigi merupakan suatu penyakit yang terjadi pada jaringan keras gigi yaitu email, dentin, dan sementum yang disebabkan oleh aktifitas jasad renik yang ada dalam suatu karbohidrat yang diragikan. Prevalensi karies gigi penduduk Indonesia mengalami kenaikan dari 43,4% menjadi 53,2% pada tahun 2013. Bakteri gram positif merupakan bakteri yang berkaitan erat dengan karies gigi, salah satunya yaitu *Streptococcus mutans*. Selain karies gigi, dirongga mulut juga terdapat penyakit yang terjadi pada jaringan periodontal. Mikroorganisme yang berperan penting dalam terjadinya penyakit periodontal salah satunya adalah *Porphyromonas gingivalis*. Salah satu cara untuk mencegah karies dan penyakit periodontal dengan pengendalian plak. Saat ini pengendalian plak dilengkapi dengan pemakaian bahan yang bersifat antibakteri. *World Health Organization* (WHO) merekomendasikan penggunaan obat tradisional yang merupakan bahan alami dalam pemeliharaan kesehatan masyarakat, pencegahan dan pengobatan penyakit. Di Indonesia tanaman kakao (*Theobroma cacao L.*) merupakan tanaman yang terus dibudidayakan hingga saat ini. Pada saat panen, umumnya petani memanen biji kakao untuk diolah menjadi coklat, dan menghasilkan limbah kulit buah kakao yang cukup banyak. Disisi lain, kulit buah kakao mempunyai banyak kandungan yang dapat diisolasi dan dimanfaatkan sehingga mempunyai nilai produktivitas yang tinggi. Salah satu kandungan terbesarnya proantosianidin (58%). Proantosianidin diduga berperan sebagai antibakteri karena memiliki kemampuan membentuk senyawa kompleks dengan protein melalui ikatan hidrogen.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi hambat minimal ekstrak proantosianidin kulit buah kakao terhadap pertumbuhan *S. mutans* dan *P. gingivalis*. Sampel penelitian yang digunakan adalah ekstrak proantosianidin kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*). Mikroorganisme yang digunakan adalah bakteri *S. mutans* dan *P. gingivalis*. Sampel *S. mutans* dibagi dalam 7 kelompok, diantaranya ekstrak proantosianidin kulit buah kakao dengan konsentrasi 64 mg/ml, 32 mg/ml, 16 mg/ml, 8 mg/ml, 4 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml dan kontrol. Sampel *P. gingivalis* dibagi dalam 7 kelompok, diantaranya ekstrak proantosianidin kulit buah kakao dengan konsentrasi 32 mg/ml, 16 mg/ml, 8 mg/ml, 4 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml, dan kontrol.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak proantosianidin kulit buah kakao mempunyai daya hambat minimal terhadap *S. mutans* pada konsentrasi 32 mg/ml dan mempunyai daya hambat minimal terhadap *P. gingivalis* pada konsentrasi 16 mg/ml. Kemudian dilakukan analisis secara statistik dengan uji *Chi-Square* untuk menguji hubungan atau pengaruh dua variabel nominal dan mengukur kuatnya hubungan antar variabel, didapatkan bahwa terdapat korelasi

antara konsentrasi dan bakteri *S. mutans*, serta antara konsentrasi dan bakteri *P. gingivalis*. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa proantosianidin kulit buah kakao memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri *S. mutans* dengan MIC 16 mg/ml dan *P. gingivalis* dengan MIC 8 mg/ml.



PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT, atas limpahan rahmat, hidayah serta karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi berjudul “Daya Hambat Ekstrak Proantosianidin Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*) Terhadap *Streptococcus mutans* dan *Porphyromonas gingivalis* Melalui Uji *Minimum Inhibition Concentration*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat penyelesaian pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada :

1. Orang tua saya, Ibu Wahyuni, Alm. Mohamad Thamrin dan Bapak Pujiantoro;
2. drg. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Pros., selaku Dekan Fakultas Kedokteran gigi Universitas Jember;
3. drg. Yani Corvianindya Rahayu, M.KG dan drg. Pujiana Endah Lestari, M.Kes selaku dosen pembimbing skripsi yang telah banyak meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan, saran, nasihat dan motivasi sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
4. Dr. drg. Atik Kurniawati, M.Kes dan drg. Tantin Ermawati, M.Kes selaku dosen penguji skripsi yang telah memberikan kritik dan saran dalam penulisan skripsi ini;
5. drg. Ristya Widi Endah Yani sebagai dosen pembimbing akademik yang telah memberikan saran, motivasi dan bimbingan selama ini;
6. Adik saya tercinta Mikhayla Oktora Putri Antoro yang selalu menjadi penyemangat, penghibur dan tak pernah henti mendoakan saya;
7. Mbak Indri dan Bu Widi selaku teknisi dan analis yang turut membantu dan membimbing dengan sabar dalam penelitian;
8. Teman-teman proyek, Yolanda Eka Putri dan Alifia Wandansari yang sudah bersama-sama berjuang. Terimakasih atas dukungan dan kerjasama yang luar biasa;

9. Partner setia saya, Yolanda Eka Putri yang selalu ada dalam suka maupun duka.
10. Teman-teman kos rempong, Fergyansa, mas Yusuf, Mas Martin, Mas Iqbal dan Mas Anto yang selalu menghibur, memberi semangat, dan do'a;
11. Teman-teman Keluarga 2;
12. Teman-teman Laboratorium Mikrobiologi, Widia, Tuing, Kukuk;
13. Teman-teman seperjuangan KAMI FKG 2015. Terimakasih atas kebersamaan dan dukungan selama ini;
14. Semua pihak yang turut membantu dalam terselesaikannya skripsi ini yang tidak mungkin disebutkan satu persatu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pendidikan khususnya dibidang kesehatan serta menjadi upaya meningkatkan mutu kesehatan masyarakat.

Jember, 17 Mei 2019

Penulis

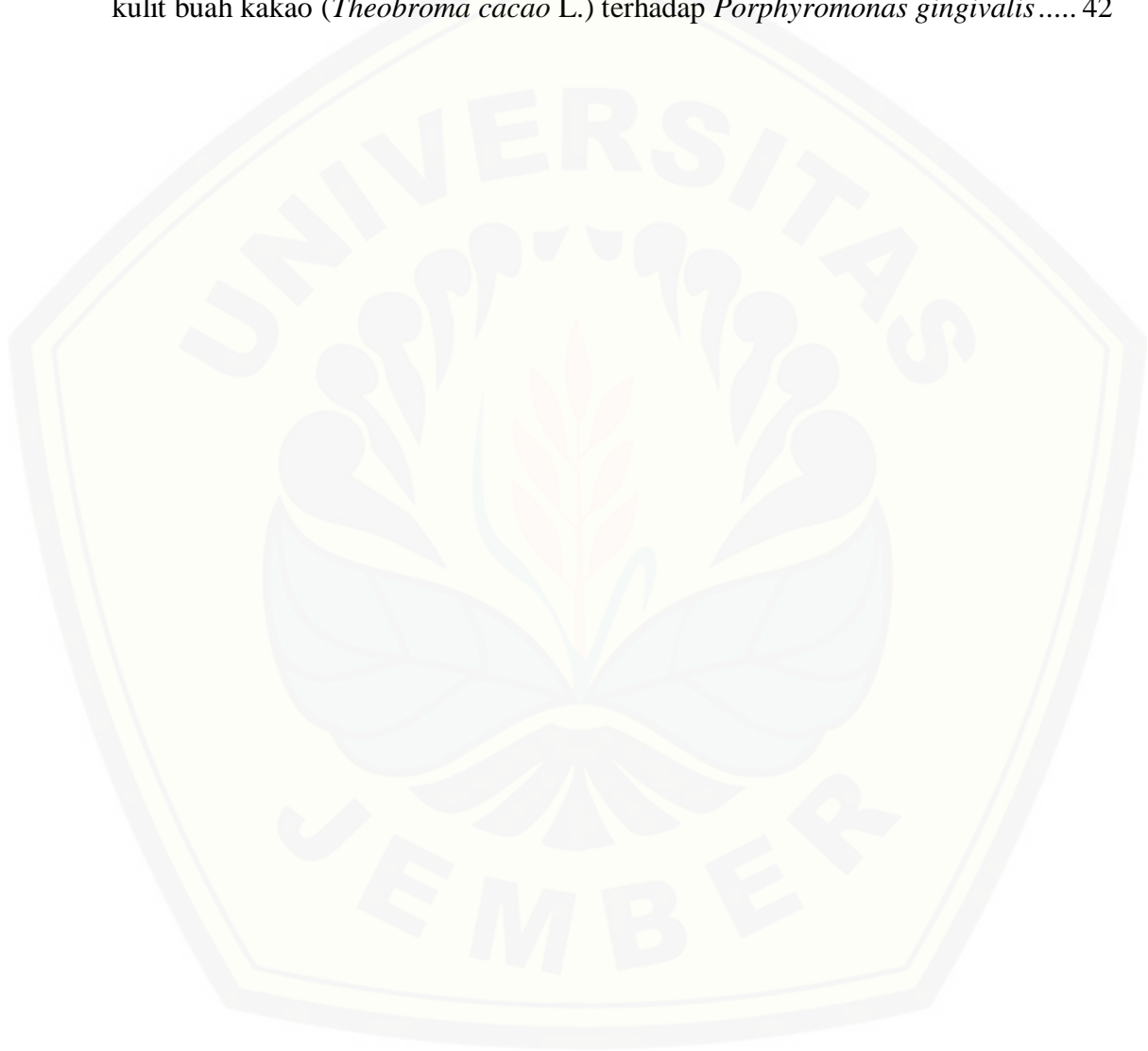
DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iii
HALAMAN MOTO.....	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN.....	viii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Karies Gigi	5
2.1.1 Pengertian Karies	5
2.1.2 Etiologi Karies	5
2.2 <i>Streptococcus mutans</i>	8
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi	8
2.2.2 Habitat <i>Streptococcus mutans</i>	9
2.2.3 Patogenitas <i>Streptococcus mutans</i>	9
2.2.4 Pertumbuhan <i>Streptococcus mutans</i>	10
2.3 <i>Porphyromonas gingivalis</i>.....	11
2.3.1 Klasifikasi dan karakteristik <i>Porphyromonas gingivalis</i>	11
2.3.2 Peran Bakteri <i>Porphyromonas gingivalis</i> dalam Patogenesis Penyakit Periodontal	13
2.4 Daya Antibakteri.....	14
2.5 Kakao (<i>Theobroma cacao L.</i>)	16
2.5.1 Taksonomi Tanaman Kakao (<i>Theobroma cacao L.</i>)	16
2.5.2 Kulit Buah Kakao.....	18
2.5.3 Kandungan Kulit Buah Kakao	19
2.6 Metode Ekstraksi	23
2.7 Metode <i>Minimum Inhibition Concentration</i>	24
2.8 Uji Kandungan Proantosianidin	26
2.9 Kerangka Konsep	28
2.10 Hipotesis	30
BAB 3 METODE PENELITIAN	31
3.1 Jenis Penelitian	31
3.2 Rancangan Penelitian	31

3.3 Sampel Penelitian	31
3.4 Tempat dan Waktu Penelitian	32
3.5 Variabel Penelitian	33
3.6 Definisi Operasional	33
3.7 Alat dan Bahan Penelitian	35
3.8 Prosedur Penelitian	35
3.9 Alur Penelitian	39
3.10 Analisis Data	40
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	41
4.1 Hasil Penelitian	41
4.2 Pembahasan	44
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	48
5.1 Kesimpulan.....	48
5.2 Saran.....	48
DAFTAR PUSTAKA.....	49
LAMPIRAN	57

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Tipe dan ciri-ciri kakao yang dikembangkan di Indonesia.....	18
Tabel 2.2 Komposisi kimia kulit buah kakao.....	20
Tabel 4.1 Hasil penelitian kadar hambat minimal (MIC) ekstrak proantosianidin kulit buah kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.) terhadap <i>Streptococcus mutans</i>	41
Tabel 4.2 Hasil penelitian kadar hambat minimal (MIC) ekstrak proantosianidin kulit buah kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.) terhadap <i>Porphyromonas gingivalis</i>	42

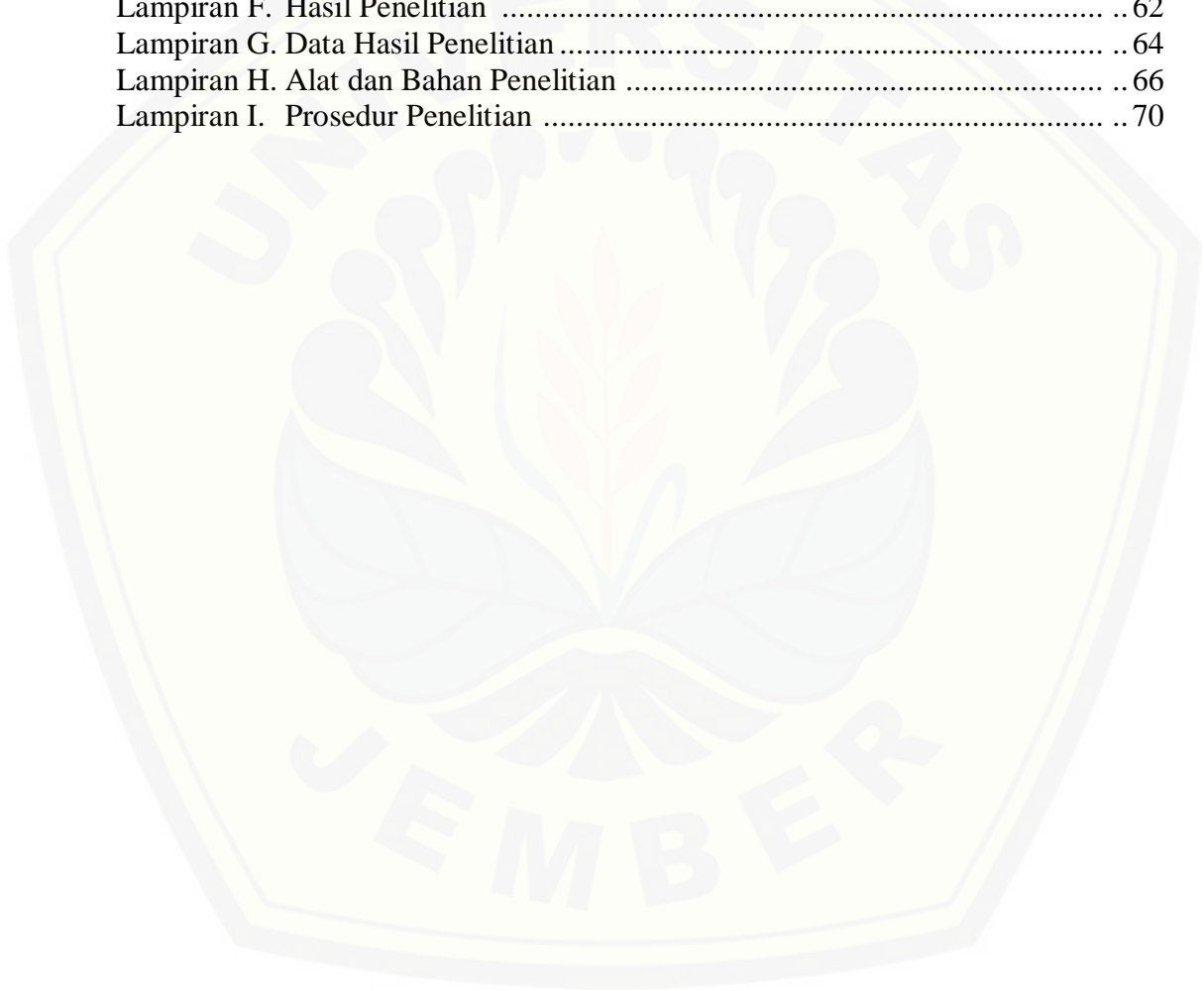


DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Diagram faktor penyebab karies	7
Gambar 2.2 Bakteri <i>Streptococcus mutans</i>	8
Gambar 2.3 Dinding sel bakteri gram positif	10
Gambar 2.4 Pola pertumbuhan <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , dan <i>Bacillus submitis</i>	11
Gambar 2.5 Porphyromonas gingivalis	12
Gambar 2.6 Dinding sel bakteri gram negatif	13
Gambar 2.7 Tipe kakao	19
Gambar 2.8 Buah kakao jenis Lindak	19
Gambar 2.9 Struktur kimia katekin	21
Gambar 2.10 Struktur kimia antosianin	22
Gambar 2.11 Struktur kimia proantosianidin	22
Gambar 2.12 Kerangka konsep	26
Gambar 4.1 Hasil Uji MIC terhadap <i>S. mutans</i>	42
Gambar 4.2 Hasil Uji MIC terhadap <i>P. gingivalis</i>	43

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran A. Surat Ijin Penelitian di Labotorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember	57
Lampiran B. Surat Ijin Penelitian di Labotorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember	58
Lampiran C. Surat Keterangan Identifikasi Tanaman	59
Lampiran D. Surat Identifikasi bakteri <i>Streptococcus mutans</i>	60
Lampiran E. Surat Identifikasi bakteri <i>Porphyromonas gingivalis</i>	61
Lampiran F. Hasil Penelitian	62
Lampiran G. Data Hasil Penelitian	64
Lampiran H. Alat dan Bahan Penelitian	66
Lampiran I. Prosedur Penelitian	70



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Berdasarkan Data Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2013 penduduk Indonesia mengalami masalah kesehatan gigi dan mulut sebesar 25,9 %, di antara masalah gigi dan mulut tersebut adalah karies dan penyakit periodontal. Persepsi dan perilaku masyarakat Indonesia terhadap kesehatan gigi dan mulut masih buruk. Ini terlihat dari masih besarnya angka karies gigi dan penyakit mulut di Indonesia yang cenderung meningkat (Sumanti, 2013). Prevalensi karies gigi penduduk Indonesia mengalami kenaikan pada tahun 2007 yaitu sebesar 43,4% menjadi 53,2% pada tahun 2013. Karies gigi merupakan suatu penyakit yang terjadi pada jaringan keras gigi yaitu email, dentin, dan sementum yang disebabkan oleh aktifitas jasad renik yang ada dalam suatu karbohidrat yang diragikan. Bakteri Gram positif merupakan bakteri yang berkaitan erat dengan karies gigi, salah satunya yaitu *Streptococcus mutans* (Taringan, 2014).

Bakteri *S. mutans* merupakan flora normal dalam rongga mulut yang akan menjadi patogen apabila terjadi peningkatan jumlah koloni yang berlebihan. Bakteri ini merupakan bakteri utama plak yang menyebabkan karies gigi melalui proses fermentasi karbohidrat pada plak di permukaan gigi. Proses ini akan menghasilkan pembentukan dan penimbunan asam yang mengakibatkan terjadinya dekalsifikasi dan destruksi enamel gigi sehingga terjadi karies (Putri *et al.*, 2010).

Selain karies gigi, di rongga mulut juga terdapat penyakit yang terjadi pada jaringan periodontal. Penyakit periodontal banyak diderita oleh manusia hampir di seluruh dunia dan mencapai 50% dari jumlah populasi dewasa. Di Indonesia sendiri penyakit periodontal merupakan masalah kesehatan gigi dan mulut yang memiliki prevalensi cukup tinggi yaitu sebesar 96,58%. Penyakit periodontal dimulai dari gingivitis yang bila tidak terawat bisa berkembang menjadi periodontitis dimana terjadi kerusakan jaringan pendukung periodontal berupa

kerusakan fiber kolagen gingiva, ligamen periodontal dan tulang alveolar (Wahyukundari, 2008). Mikroorganisme yang berperan penting dalam terjadinya penyakit periodontal salah satunya adalah *Porphyromonas gingivalis*.

Bakteri *P. gingivalis* dapat menginduksi terjadinya gingivitis dan periodontitis (Newman dkk., 2006). Unsur-unsur yang mempengaruhi virulensi *P. gingivalis* salah satunya adalah gingipain. Gingipain dapat mengubah kondisi lingkungan mulut dengan meningkatkan pH mulut yang baik untuk pertumbuhan bakteri anaerob gram negatif lain, sehingga terjadi peningkatan jumlah bakteri dan gangguan keseimbangan flora normal rongga mulut (Cugini dkk., 2013).

Salah satu cara untuk mencegah karies dan penyakit periodontal dengan pengendalian plak. Saat ini pengendalian plak dilengkapi dengan pemakaian bahan yang bersifat antibakteri (Pratiwi, 2005). Dalam dunia kesehatan terjadi pergeseran pemeliharaan kesehatan, dari penggunaan bahan sintetik beralih ke bahan alami yang berefek samping kecil. *World Health Organization* (WHO) merekomendasikan penggunaan obat tradisional yang merupakan bahan alami dalam pemeliharaan kesehatan masyarakat, pencegahan dan pengobatan penyakit (WHO, 2008).

Di Indonesia tanaman kakao (*Theobroma cacao L.*) merupakan tanaman yang terus dibudidayakan hingga saat ini, karena kakao mempunyai nilai ekonomi yang tinggi yang dapat dijadikan sebagai sumber pendapatan perkebunan ataupun kelompok masyarakat (Sukamto, 2013). Kabupaten Jember merupakan salah satu di antara daerah penghasil kakao dengan jumlah yang dihasilkan pertahunnya sebanyak tujuh belas ribu ton (Anonim, 2009). Pada saat panen, umumnya petani memanen biji kakao untuk diolah menjadi coklat, dan menghasilkan limbah kulit buah kakao yang cukup banyak. Keberadaan limbah tersebut sering kali tidak dimanfaatkan secara baik dan kadang dibiarkan begitu saja menjadi sampah pertanian. Limbah kulit buah kakao yang dihasilkan dalam jumlah banyak akan menjadi masalah jika tidak ditangani dengan baik karena produksi limbah padat ini mencapai lebih dari 60% dari total produksi buah (Harsini & Susilowati, 2010).

Disisi lain, kulit buah kakao mempunyai banyak kandungan yang dapat diisolasi dan dimanfaatkan sehingga mempunyai nilai produktivitas yang tinggi. Salah satu kandungan terbesarnya yaitu polifenol yang berupa katekin (37%), antosianin (4%), dan proantosianidin (58%) (Hii *et al.*, 2009). Wahyudi dan Pujianto (2015) menyatakan bahwa pada kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) mengandung senyawa fitokimia berupa katekin jenis flavonoid, teobromin, tanin, dan saponin yang efektif digunakan sebagai penghambat pertumbuhan mikroba.

Penelitian sebelumnya didapatkan bahwa ekstrak methanol kulit buah kakao dapat menghambat pertumbuhan *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumonia* ATCC 13047, dan *Bacillus subtilis* (Fapohunda & Afolayan, 2012). Polifenol yang terkandung dalam kakao dapat mencegah proses pembentukan karies karena aksi antibakterinya sehingga secara signifikan dapat mengurangi pembentukan biofilm dan produksi asam oleh *S. mutans* dan *Streptococcus sanguinis* (Ferrazzano *et al.*, 2009). Penelitian Mulyatni (2012) melaporkan bahwa ekstrak kulit buah kakao berpotensi sebagai antibakteri terhadap bakteri *S. aureus*, *B. Subtilis* dan *E. Coli*. Sedangkan pada penelitian Bodet (2006) mendapatkan jika proantosianidin buah *cranberry* dapat menghambat aktifitas proteolitik, secara khusus pada gingipain dari *P. gingivalis* dan menghambat multiplikasi patogen agar tidak terjadi kerusakan jaringan.

Proantosianidin berperan sebagai antibakteri karena memiliki kemampuan membentuk senyawa kompleks dengan protein bakteri melalui ikatan hidrogen, jika terbentuk ikatan hidrogen antara proantosianidin dengan protein kemungkinan protein akan terdenaturasi sehingga metabolisme bakteri menjadi terganggu (Makkar, 2003). Berdasarkan uraian tersebut, maka penulis berkeinginan melakukan penelitian tentang daya hamba ekstrak proantosianidin kulit buah kakao dalam menghambat pertumbuhan *S. mutans* dan *P. gingivalis* dengan menggunakan uji Minimum Inhibition Concentration.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, timbul pertanyaan sebagai berikut:

1. Apakah ekstrak proantosianidin kulit buah kakao mempunyai daya hambat terhadap bakteri *Streptococcus mutans* dan *Porphyromonas gingivalis*?
2. Berapakah konsentrasi hambat minimal ekstrak proantosianidin kulit buah kakao terhadap bakteri *Streptococcus mutans* dan *Porphyromonas gingivalis*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu:

1. Mengetahui apakah ekstrak proantosianidin kulit buah kakao dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dan *Porphyromonas gingivalis*.
2. Mengetahui konsentrasi hambat minimal ekstrak proantosianidin kulit buah kakao terhadap bakteri *Streptococcus mutans* dan *Porphyromonas gingivalis*

1.4 Manfaat Penelitian

1. Memberikan wawasan ilmu pengetahuan mengenai pengaruh ekstrak proantosianidin kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) dalam menghambat *Streptococcus mutans* dan *Porphyromonas gingivalis*.
2. Dapat digunakan sebagai dasar pengembangan dan pemanfaatan ekstrak kulit buah kakao yang memiliki daya antibakteri dalam menghambat *Streptococcus mutans* dan *Porphyromonas gingivalis* sehingga dapat menjadi bahan alternatif dalam pencegahan karies gigi dan penyakit periodontal.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Karies Gigi

2.1.1 Pengertian Karies

Karies adalah suatu penyakit jaringan keras gigi, yaitu email, dentin, dan sementum, yang disebabkan oleh aktivitas jasad renik dalam karbohidrat yang dapat diragikan. Karies ditandai dengan adanya demineralisasi jaringan keras gigi yang diikuti oleh kerusakan bahan organiknya. Hal tersebut mengakibatkan terjadinya invasi bakteri dan kematian pulpa serta penyebaran infeksi ke jaringan periapiks yang dapat menyebabkan nyeri (Putra, 2016).

2.1.2 Etiologi Karies

Proses terjadinya karies melibatkan empat faktor umum, yaitu host, mikroorganisme plak, substrat, dan waktu yang diperlukan untuk perkembangan karies. Faktor-faktor ini diperlukan untuk inisiasi dan perkembangan lesi karies walaupun memiliki cara yang berbeda dalam berinteraksi (Kartika, 2015).

a. Faktor Host

Faktor host yang utama adalah struktur dan komposisi enamel maupun aliran saliva. Pada beberapa daerah gigi yang sama dapat lebih rentan terhadap serangan karies daripada yang lain. Kerentanan terhadap demineralisasi, terkait dengan kandungan mineral, terutama *fluoride*, dan struktur daerah tertentu enamel (Kartika, 2015). Beberapa daerah yang memudahkan perlekatan bakteri adalah:

1. Pit dan fisur pada permukaan okslusal molar dan premolar
2. Permukaan halus di daerah aproksimal sedikit di atas tepi gingiva
3. Email pada tepian di daerah leher gigi sedikit di atas tepi gingiva
4. Permukaan akar yang terbuka, yang merupakan daerah tempat melekatnya plak pada pasien dengan resesi gingiva karena penyakit periodontium.
5. Tepi tumpatan terutama yang *underfilling* atau *overfilling*

6. Permukaan gigi yang berdekatan dengan gigi tiruan dan jembatan (Putra, 2016).

Selain anatomi permukaan gigi, saliva juga berperan dalam proses terbentuknya karies gigi. Tindakan pembersihan mekanis dari saliva merupakan mekanisme yang efektif dalam menghilangkan sisa-sisa makanan dan mikroorganisme mulut. Saliva mempunyai kapasitas buffer yang tinggi dan cenderung menetralkan asam (Putra, 2016). Saliva juga memiliki potensi untuk melakukan remineralisasi karies yang masih dini karena banyak mengandung ion kalsium dan fosfat. Potensi saliva dalam melakukan remineralisasi meningkat apabila terdapat ion fluor.

- b. Faktor Mikroorganisme Plak

Plak gigi merupakan lapisan pada permukaan gigi yang mengandung bakteri serta produk-produknya. Akumulasi bakteri plak terbentuk melalui serangkaian tahapan, diawali dengan terbentuknya pelikel (lapisan organik amorf) yang menutupi permukaan email. Pelikel terdiri atas glikoprotein yang diendapkan dari saliva dan terbentuk segera setelah penyikatan gigi. Sifatnya sangat lengket dan mampu membantu melekatkan bakteri-bakteri tertentu pada permukaan gigi (Kartika, 2015). Bakteri yang berbentuk kokus merupakan bakteri utama yang mula-mula menghuni pelikel. Mikroorganisme tersebut tumbuh, berkembang biak, dan mengeluarkan senyawa ekstraseluler yang lengket dan akan menjerat berbagai bakteri lain. Plak akan bertambah tebal dan mengandung berbagai macam mikroorganisme. Flora plak yang awalnya didominasi oleh bentuk kokus akan berubah menjadi flora campuran yang terdiri dari bakteri berbentuk kokus, batang, dan filament (Kartika, 2015).

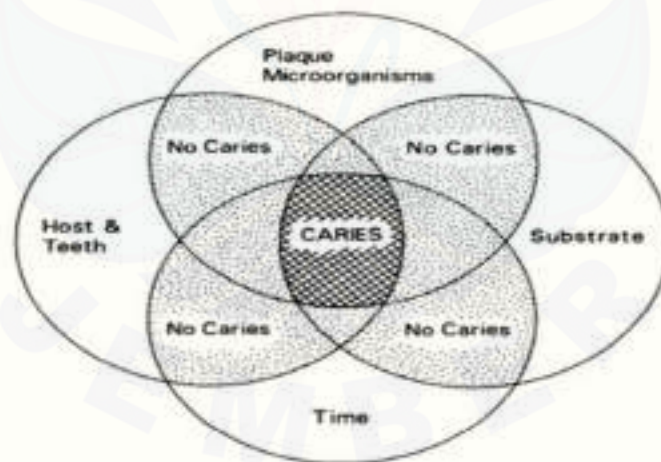
- c. Substrat

Bakteri plak dapat meragikan beberapa jenis karbohidrat yang menempel pada gigi sehingga menghasilkan asam yang dapat mendemineralisasikan gigi. Bakteri plak dapat mengubah beberapa jenis karbohidrat menjadi asam dengan

waktu minimum berkisar antara 20 menit hingga beberapa jam. Karbohidrat dengan berat molekul rendah lebih cepat untuk diragikan. Karbohidrat dengan jenis sukrosa memiliki waktu minimum lebih singkat dibandingkan dengan glukosa, fruktosa, maupun laktosa. Dibutuhkan waktu 30-60 menit untuk kembali ke pH yang normal. Konsumsi gula yang tinggi akan mengakibatkan pH rongga mulut menjadi dibawah normal sehingga terjadi demineralisasi gigi (Putra, 2016).

d. Waktu

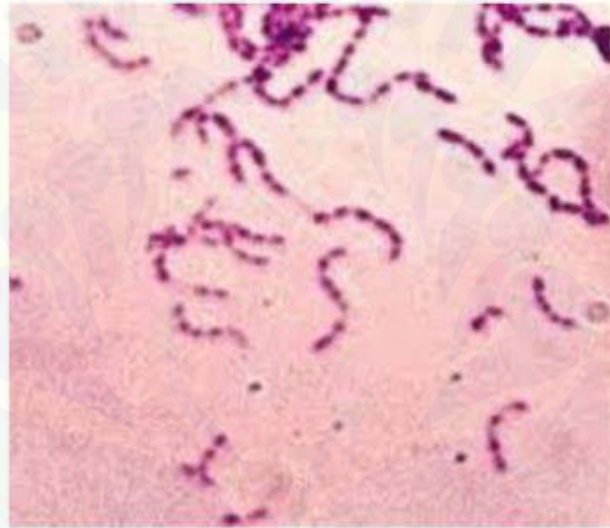
Potensi saliva dalam mendepositkan kembali mineral selama berlangsungnya proses karies menandakan bahwa proses karies terdiri atas periode kerusakan dan perbaikan yang silih berganti, sehingga proses karies tidak berlangsung secara singkat tetapi dibutuhkan waktu. Oleh karena itu, apabila terdapat saliva didalam rongga mulut, maka karies tidak akan menghancurkan gigi dalam periode hari atau minggu, melainkan dalam bulan ataupun tahun, sehingga terdapat kesempatan untuk menghentikan proses karies (Putra, 2016).



Gambar 2.1 Diagram faktor penyebab karies (Kartika, 2015)

2.2 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)

Streptococcus mutans merupakan bakteri gram positif (+), bersifat non motil (tidak bergerak), berdiameter 1-2 μm , bakteri anaerob fakultatif. Memiliki bentuk bulat atau bulat telur, tersusun seperti rantai dan tidak membentuk spora seperti ditunjukkan dengan (Gambar 2.2) (Samaranayake, 2002; Regina, 2007). Ari (2008) mengatakan bahwa *S. mutans* biasanya ditemukan pada rongga gigi manusia yang luka dan menjadi bakteri yang paling kondusif menyebabkan karies pada email gigi.



Gambar 2.2 Bakteri *Streptococcus mutans* (Todar, 2008).

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Secara taksonomi, *S. mutans* diklasifikasikan sebagai berikut (Bidarisugma, 2012) :

Kingdom : Bacteria
Filum : Firmicutes
Ordo : Lactobacillales
Famili : Streptococceae
Genus : Streptococcus
Species : *Streptococcus mutans*.

Pada umumnya, warna dari *S. mutans* adalah putih, abu-abu, dan kuning (Dworkin et al., 2006). Bakteri ini mempunyai struktur selubung sel yang relatif sederhana, hanya terdiri dari dua sampai tiga lapisan, yaitu membran sitoplasma dan lapisan peptidoglikan yang tebal. Bakteri Gram positif berbeda dengan bakteri Gram negatif yang memiliki struktur selubung sel yang berlapis banyak dan sangat kompleks, yaitu lapisan lipoprotein, lapisan lipopolisakarida, dan lapisan peptidoglikan. Hal ini yang menyebabkan bakteri Gram positif, salah satunya *S. mutans* lebih rentan terhadap bahan antimikroba karena senyawa antimikroba mudah masuk ke dalam sel dan menemukan sasaran untuk bekerja (Brooks et al., 2007).

2.2.2 Habitat *S. mutans*

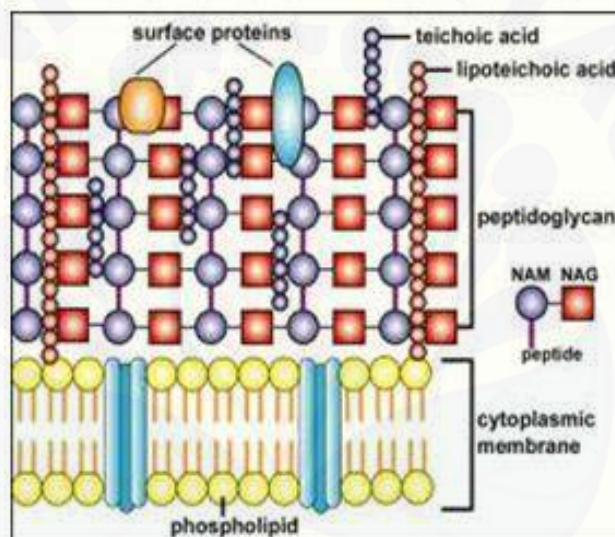
Bakteri *S. mutans* merupakan flora normal yang berada dalam rongga mulut, faring, dan intestine manusia (Forssten et al., 2010). Rongga mulut memiliki sifat yang lembab dan hangat sehingga dapat menjadi lingkungan untuk pertumbuhan mikroorganisme. *S. mutans* di rongga mulut banyak ditemukan pada plak gigi dan pada lesi karies (Simon, 2007). Sifat *S. mutans* adalah fakultatif anaerob, artinya dapat hidup dalam keadaan tidak adanya oksigen atau adanya oksigen untuk menghasilkan energi melalui respirasi jika terdapat oksigen dan jalur fermentasi jika tidak terdapat oksigen yang cukup (Samaranayake, 2012).

2.2.3 Patogenitas *S. mutans*

Bakteri *S. mutans* memiliki sifat asidurik dan asidogenik sehingga dapat berkembang dengan baik pada lingkungan dengan pH rendah dan dapat memproduksi asam dengan melakukan metabolisme karbohidrat (Richard et al., 2006). *S. mutans* mengubah sukrosa dan karbohidrat pada makanan menjadi asam melalui proses fermentasi yang kemudian akan menurunkan pH plak menjadi 4,5-5,5 dalam waktu 1-3 menit. Asam yang di produksi bakteri akan dinetralkan oleh sistem buffer saliva, yaitu dengan bertambahnya ion bikarbonat, sehingga pH

kembali normal. Proses demineralisasi gigi dapat terjadi apabila terdapat penurunan pH secara terus menerus.

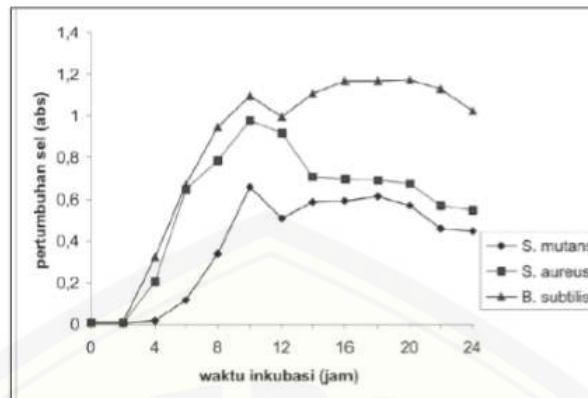
Bakteri *S. mutans* merupakan mikroorganisme utama penyebab karies, sangat menyukai kondisi asam saat pH menurun (Soesilo *et al.*, 2005). Sifat penting lain dari *S. mutans* adalah mampu membentuk biofilm yang dikenal sebagai plak pada permukaan gigi. Pembentukan plak pada permukaan gigi melibatkan tiga langkah yang berbeda. Pertama, pembentukan *conditioning film* atau diperoleh pelikel pada email gigi. Kedua, adanya interaksi sel ke-pelikel dari koloni primer. Ketiga, interaksi sel ke sel dari koloni baru dengan koloni primer.



Gambar 2.3 Dinding sel bakteri gram positif

2.2.4 Pertumbuhan *S. mutans*

Pertumbuhan bakteri *S. mutans* dalam keadaan normal pada media *Nutrient Broth* selama 24 jam, diketahui bakteri dapat beradaptasi setelah 2 jam. Fase logaritmik atau fase eksponensial dicapai setelah waktu pertumbuhan 10-12 jam. Selanjutnya, fase stasioner pada saat pertumbuhan mencapai 12-20 jam. Pada jam ke 20 setelah pertumbuhan, terdapat fase kematian *S. mutans* (Rindit *et al.*, 2008).



Gambar 2.4 Pola pertumbuhan *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, dan *Bacillus submitis* pada media nutrient broth selama 24 jam dengan suhu 37°C (Pambayun et al., 2008).

2.3 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)

Porphyromonas gingivalis adalah bakteri Gram-negatif anaerob dimana bakteri ini merupakan flora normal di dalam rongga mulut manusia. Bakteri ini ditemukan banyak pada jaringan periodontal yang terinflamasi, yaitu sekitar 85 % (Devi, 2017; Bostanci, 2015). Bakteri ini dapat menyebabkan kerusakan jaringan periodontal karena mempunyai faktor virulensi seperti lipopolisakarida, gingipains, fimbriae, dan kapsul. Lipopolisakarida (LPS) adalah komponen dinding sel bakteri gram negatif yang merangsang pelepasan berbagai sitokin. Sitokin adalah suatu polipeptida yang diproduksi sebagai respon terhadap rangsangan mikroba dan antigen lainnya, berperan sebagai mediator serta mengatur reaksi imun dan inflamasi. Berbagai sitokin yang berperan dalam patogenesis periodontitis adalah interleukin-1, interleukin-6 dan *tumor necrosis factor-α* (Mealey dan Perry, 2006).

2.3.1 Klasifikasi dan karakteristik *P. gingivalis*

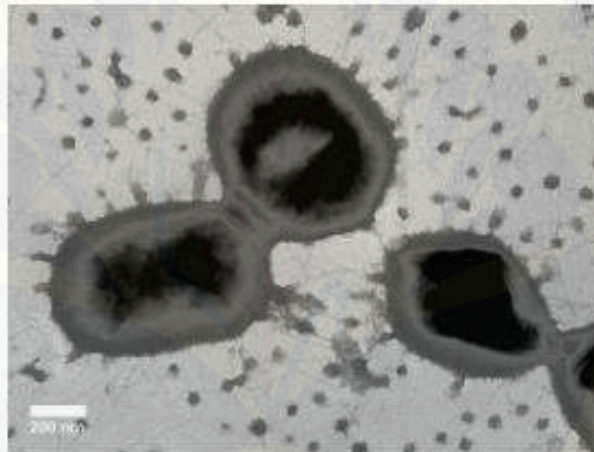
Secara taksonomi *P. gingivalis* diklasifikasikan sebagai berikut (MicrobeWiki, 2010) :

Kingdom : Bacteria

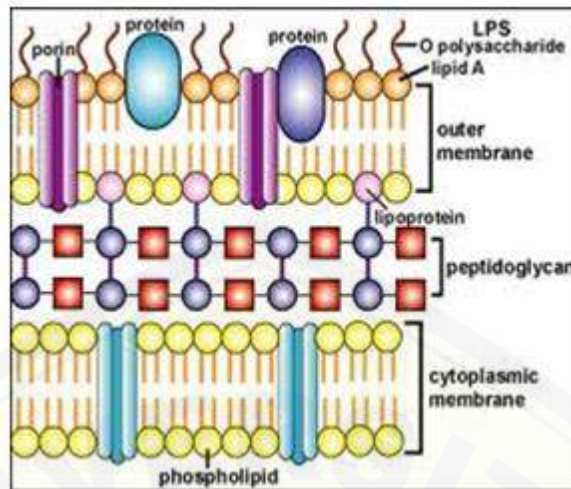
Superphylum : Bactroidetes/ Chlorobi group

Phylum : Bacteroidetes
Class : Bacteroides
Ordo : Bacteriodales
Family : Porphyromonadaceae
Genus : Porphyromonas
Species : *Porphyromonas gingivalis*

Karakter *P. gingivalis* adalah memiliki bercak hitam, *pleomorphic* terutama berbentuk batang pendek, non-motil, gram negatif, non-fermentasi, tidak membentuk spora, obligat anaerob, asaccharolytic, dapat tumbuh optimum pada suhu 36,8- 39°C dengan pH antara 7.5-8.0 (Iriano, 2008).



Gambar 2.5 *Porphyromonas gingivalis* strain ATCC 33277 yang berumur 4 hari pada lempeng agar (sumber: *Porphyromonas gingivalis* Genome Project, 2002).



Gambar 2.6 Dinding sel bakteri gram negatif

2.3.2 Peran Bakteri *P. gingivalis* dalam Patogenesis Penyakit Periodontal

Periodontitis adalah suatu penyakit peradangan pada jaringan penyangga gigi yang disebabkan oleh mikroorganisme tertentu sehingga mengakibatkan kerusakan yang progresif pada ligamen periodontal dan tulang alveolar ditandai dengan terbentuknya poket, resesi, atau kedua-duanya. Kerusakan ini dapat disebabkan oleh toksin yang diproduksi oleh bakteri maupun oleh aktifitas sel-sel dan mediator proinflamatori yang berlebihan. Komponen struktur bakteri dapat merangsang perkembangan reaksi kekebalan host yang tidak hanya mampu melindungi inang terhadap infeksi tetapi juga menyebabkan kerusakan jaringan periodontal parah. Salah satu penyebab dari terjadinya periodontitis kronis adalah *P. gingivalis* (Carranza et al ., 2006).

Komponen dinding sel dari *P. gingivalis* seperti lipopolisakarida (LPS) dapat merangsang pelepasan sitokin pro-inflamasi (IL-1b, IL-6, CXCL8 atau IL-8, TNF-a), prostaglandin, oksida nitrat, dan radikal bebas (Siquera dan Rocas, 2007). Faktor virulensi bakteri yang dihasilkan oleh bakteri untuk merusak jaringan host yang menyebabkan pelepasan mediator biologis dari jaringan host dimana mediator tersebut merupakan reaksi dari faktor virulensi bakteri. Mediator diproduksi sebagai bagian dari respon host yang berkontribusi terhadap kerusakan jaringan. Mediator seperti proteinase, sitokin, prostaglandin, dan berbagai enzim

yang diproduksi oleh mikroorganisme penyebab kerusakan jaringan lokal. Adanya bakteri yang berdekatan dengan celah gingiva dan kontak sehingga mengeluarkan produksi toksik dari bakteri tersebut, sehingga sel inang memicu monosit, PMN, makrofag dan sel-sel lain untuk melepaskan mediator inflamasi seperti IL-1, TNF- α , dan prostaglandin E2. IL-1 dan TNF- α , MMP memiliki peran penting pada periodontal yang menyebabkan terjadinya kerusakan jaringan kolagen gingiva (Miyazaki, 2011).

2.4 Daya Antibakteri

Antibakteri merupakan suatu zat yang sifatnya mampu menghambat pertumbuhan serta perkembangan suatu mikroorganisme. Zat tersebut harus mampu menghambat bahkan membunuh mikroorganisme tersebut bila diharuskan, namun tidak membahayakan bagi manusia. Priyanto (2010) menyatakan bahwa suatu zat untuk dapat digunakan sebagai antibakteri harus mampu menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri patogen atau juga mempunyai sifat toksisitas selektif tetapi tanpa membahayakan manusia. Antibakteri dalam kadar terendah yang mampu menghambat pertumbuhan suatu bakteri merupakan Kadar Hambat Minimum (KHM). Sedangkan kadar terendah dari antibakteri yang mampu membunuh suatu bakteri setelah masa inkubasi 24 jam, ditetapkan sebagai Kadar Bunuh Minimum (KBM) (Radji, 2016).

Menurut Madigan (2003), zat antibakteri berdasarkan efek toksisitasnya terhadap pertumbuhan bakteri dapat dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu:

a. Bakteriostatik

Bakteriostatik adalah efek yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri, tetapi tidak menyebabkan kematian seluruh bakteri. Mekanisme ini biasanya terjadi pada ribosom yang menyebabkan sintesis protein terhambat.

b. Bakterisidal

Suatu zat yang memiliki sifat bakterisidal dapat membunuh bakteri, tetapi tidak menyebabkan sel bakteri pecah atau lisis.

c. Bakteriolitik

Senyawa bakteriolitik adalah antibakteri yang dapat menyebabkan lisisnya sel mikrobial target sehingga jumlah sel total mikrobial menurun atau berkurang.

Berdasarkan mekanisme kerja dari antibakteri, dapat dibedakan menjadi lima kelompok, yaitu:

a. Antibakteri yang menghambat sintesis dinding sel mikroba

Dinding sel bakteri memiliki peranan yang sangat penting seperti melindungi sitoplasma, memelihara bentuk sel dan mencegah lisis karena tekanan osmosis. Pada bakteri Gram positif struktur dinding selnya relatif sederhana dengan lapisan peptidoglikan yang relatif tebal, sedangkan pada bakteri Gram negatif memiliki struktur dinding sel yang relatif lebih kompleks dengan lapisan peptidoglikan yang relatif tipis (Suwandi, 1992). Antibakteri menghambat sintesis peptidoglikan yang merupakan komponen utama pembentuk dinding atau membran bakteri. Jika dinding sel tersebut rusak maka akan terjadi lisisnya sel atau tidak dapat membelah.

b. Antibakteri yang mengganggu permeabilitas membran sel mikroba

Menurut Suwandi (1992), membran sel berfungsi sebagai pintu keluar masuknya substansi dari dan keluar sel melalui sifat permeabilitas selektifnya. Jika permeabilitasnya mengalami gangguan, ion dan makromolekul akan lolos dari sel dan akhirnya sel mengalami kerusakan atau kematian.

c. Antibakteri yang mengganggu metabolisme sel mikroba

Asam folat sangat dibutuhkan oleh bakteri untuk kelangsungan hidupnya. Bakteri patogen harus mensintesis sendiri asam folat dari asam para amino benzoate (PABA). Apabila bakteri ini tidak mampu bersaing dengan antibakteri untuk ikut serta pada pembentukan asam folat, mengakibatkan terbentuknya analog asam folat non fungsional yang kemudian menyebabkan kehidupan bakteri akan terganggu.

d. Antibakteri yang menghambat sintesis protein sel mikroba

Sintesis protein berlangsung di ribosom, dengan bantuan mRNA dan juga tRNA. Pada bakteri, ribosom terdiri dari dua sub unit yang berdasarkan konstanta sedimentasinya dinyatakan sebagai ribosom 30s dan 50s. Jika zat antibakteri berikatan dengan komponen ribosom 30s pada mRNA akan menyebabkan tRNA salah dalam membaca kode tersebut sehingga menyebabkan terbentuknya protein yang tidak normal dan non fungsional bagi sel bakteri tersebut.

e. Antibakteri yang menghambat atau merusak asam nukleat sel mikroba

Menurut Suwandi (1992), asam nukleat adalah bagian yang sangat vital bagi perkembangbiakan sel. Mekanisme kerjanya adalah dengan berikatan dengan enzim polimerase-RNA sehingga dapat menghambat RNA dan DNA yang akan menyebabkan aktivitas seluler mengalami gangguan.

2.5 Kakao (*Theobroma cacao L.*)

Tanaman kakao berasal dari daerah hutan tropis hulu sungai Amazon. Tanaman kakao hidup pada hutan hujan tropis yang terlindung di bawah pohon besar, suhu tidak terlalu tinggi, kelembapan cukup, dan angin tidak terlalu kencang (Susanto, 1994). Pada era modern ini tanaman kakao dimanfaatkan dalam bidang industri pangan, farmasi dan kosmetika (PPPKKI, 2010).

2.5.1 Taksonomi Tanaman Kakao (*Theobroma cacao L.*)

Tanaman kakao (*Theobroma cacao L.*) termasuk familia *Sterculiaceae*, merupakan suatu tanaman tropis yang mempunyai 50 genus dan 700 spesies atau lebih. Dalam taksonomi, kakao diklasifikasikan sebagai berikut (Tjitrosoepomo, 2007) :

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Spermatophyta
Subdivisio	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Ordo	: Malvales/Columniferae
Famili	: Sterculiaceae

Genus : *Theobroma*

Spesies : *Theobroma cacao L.*

Berdasarkan tipe populasinya tanaman kakao dapat dibagi menjadi tiga kelompok yaitu :

a. Criollo

Criollo memiliki kualitas yang tinggi dengan aroma dan cita rasanya. Kebanyakan criollo tumbuh di Amerika Tengah dan Karibia. Varietas criollo yang ada di Indonesia dikenal dengan kakao mulia atau edel kakao atau *fine flavour cacao* dan memiliki buah berwarna merah (Ide, 2008). Pertumbuhan tanaman cacao tipe criollo kurang kuat, daya hasilnya lebih rendah dibanding forestero yang relatif rentan terhadap gangguan hama dan penyakit (Sahardi, 2015).

b. Forastero

Forastero umumnya termasuk kakao bermutu rendah atau disebut kakao curah atau *bulk cacao* (Susanto, 1994). Jenis kakao ini lebih tahan, mudah pengolahannya dan lebih banyak tumbuh, terutama brazil dan afrika. Jenis forastero dikenal sebagai penghasil biji kakao lindak. Kakao lindak merupakan kakao kualitas kedua dan digunakan sebagai bahan komplementer (pelengkap) dalam mengelola kakao mulia. Meskipun termasuk kualitas kedua dan digunakan sebagai bahan komplementer, kakao lindak mendominasi seluruh perkebunan kakao di Indonesia (Ide, 2008).

c. Trinitario

Trinitario yang merupakan keturunan dari Forastero dan Criollo. Forastero diproduksi dan diperdagangkan dalam jumlah yang lebih besar daripada Criollo dan Trinitario (Sahardi, 2015).

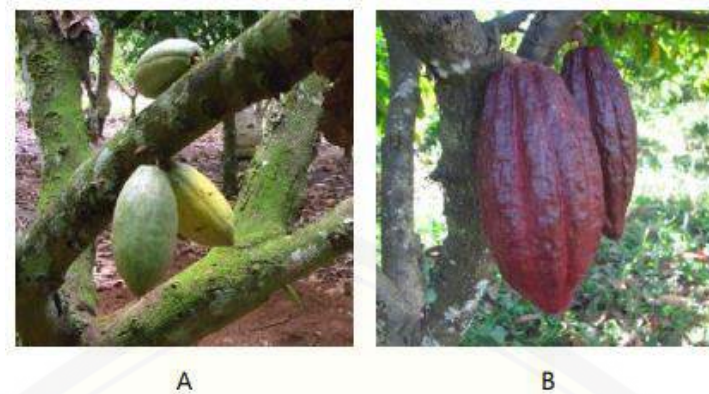
Tabel 2.1 Tipe dan ciri-ciri kakao yang dikembangkan di Indonesia

No	Ciri-ciri	Tipe/jenis			Keterangan
		Criollo	Forastero	Trinitario	
1.	Warna buah	Merah	Hijau	Beragam	Tipe Trinitario merupakan hibrida dari criollo dan forastero (secara alami) sifat-sifatnya ada diantara keduanya.
2.	Kulit buah	Kasar	Halus	Kasar s/d halus	
3.	Warna biji	Putih	Ungu	Ungu	
4.	Bentuk biji	Bulat besar	Lonjong pipih	Lonjong pipih	
5.	Kadar lemak	Sedikit	Banyak	Sedang	
6.	Citarasa	Baik	Sedang	Sedang	
7.	Ketahanan hama dan penyakit	Kurang tahan	Lebih tahan	Cukup tahan	
8.	Pertumbuhan tanaman	Kurang kuat	Kuat dan cepat	Sedang dan cepat	
9.	Produksi	Sedikit	Tinggi	Sedang s/d tinggi	

Sumber : Komisi Kakao Indonesia (2006).

2.5.2 Kulit Buah Kakao

Kulit buah memiliki 10 alur dalam dan dangkal yang letaknya berselang-seling. Pada tipe criollo dan trinitario alur kelihatan jelas, kulit buahnya tebal tetapi lunak dan permukaannya kasar. Sebaliknya, pada tipe forastero, permukaan kulit halus, tipis tetapi keras (Karnawati, 2010).



Gambar 2.7 (A) Kakao lindak (Forastero); (B) kakao mulia (Corillo) (Sumber : Budidaya dan Pasca Panen KAKAO)



Gambar 2.8 Buah Kakao Jenis Lindak

2.5.3 Kandungan Kulit Buah Kakao

Buah kakao terdiri dari 3 komponen utama, yaitu kulit buah, plasenta, dan biji. Komponen terbesar dari buah kakao adalah kulit buah (lebih dari 70% berat buah masak). Persentase biji kakao dalam buah antara 27-29%, sisanya plasenta yang merupakan pengikat dari sekitar 30-40 biji yang terdapat dalam buah (Sri Mulato et al., 2005). Kulit buah kakao mempunyai komposisi kimia seperti pada tabel.

Tabel 2.2 Komposisi kimia kulit buah kakao

Komponen	Presentase
Katekin	37%
Antosianin	4%
Proantosianidin	58%

(sumber: Hii *et al.*, 2009)

Kulit buah kakao diketahui mengandung senyawa aktif alkaloid yaitu theobromin (*3,7-dimethylxantine*). Salah satu efek dari theobromin adalah sebagai penenang, sehingga zat tersebut menjadi faktor pembatas pada pemakaian limbah kulit buah kakao sebagai pakan ternak (Helmestein, 2010). Senyawa alkaloid merupakan senyawa organik yang memiliki atom nitrogen dan bersifat basa (alkali) dan dapat menyebabkan koagulasi protein sel bakteri, sehingga menyebabkan penghambatan pertumbuhan bakteri. Koagulasi protein akan mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri yang menyebabkan lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh, sehingga menyebabkan kematian sel bakteri (Mulyatni, 2012).

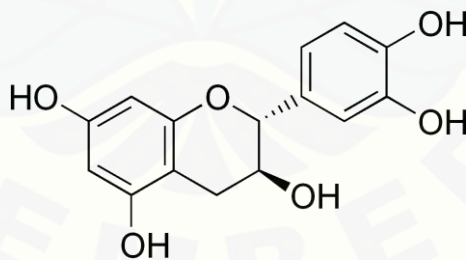
Kulit buah kakao mengandung senyawa aktif flavonoid atau tanin terkondensasi atau terpolimerisasi (Mulyatni, 2012). Berdasarkan strukturnya, tanin dibedakan menjadi dua kelas yaitu tanin terkondensasi dan tanin terhidrolisis. Tanin terhidrolisis biasanya ditemukan dalam konsentrasi yang lebih rendah pada tanaman dibandingkan dengan tanin terkondensasi. Tanin terkondensasi terdiri dari beberapa unit flavonoid (flavan-3-ol) yang dihubungkan oleh ikatan karbon (Lisan, 2015).

Tanin terkondensasi biasanya tidak dapat dihidrolisis, tetapi dapat terkondensasi menghasilkan asam klorida. Tanin jenis ini kebanyakan terdiri dari polimer flavonoid yang merupakan senyawa fenol. Nama lain dari tanin ini adalah proanthocyanidin, yang merupakan polimer dari flavonoid yang dihubungkan melalui ikatan C-8 dengan C-4 (Lisan, 2015). Tanin terhidrolisis biasanya berikatan dengan karbohidrat dengan membentuk jembatan oksigen, maka dari itu tanin ini dapat dihidrolisis dengan menggunakan asam sulfat atau asam klorida.

Salah satu contoh jenis tanin ini adalah gallotanin, dua asam galat akan membentuk tanin terhidrolisis yang disebut ellagiatanin (Lisan, 2015).

Senyawa fenolik akan berinteraksi dengan protein membran sel bakteri melalui proses adsorpsi dengan cara terikat pada bagian hidrofilik membran sel. Senyawa fenolik selanjutnya akan masuk ke dalam membran sel dan menyebabkan presipitasi protein sel. Hal tersebut mengganggu permeabilitas membran sel, sehingga membran sel dapat mengalami lisis (Mulyatni, 2012). Menurut Hii et al., 2009 Ada tiga komponen utama polifenol pada kakao, yakni katekin (37%), antosianin (4%), dan proantosianidin (58%) (Tabel 2.2).

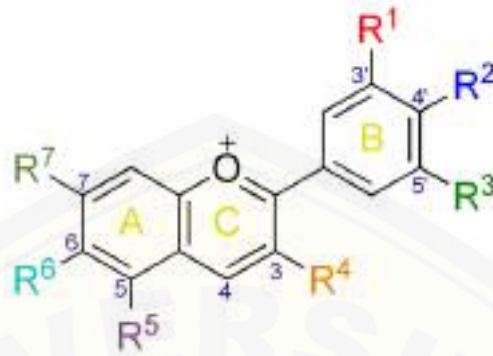
Katekin adalah senyawa polifenol alami, merupakan metabolit sekunder dan termasuk dalam penyusun golongan tanin. Katekin biasanya disebut juga asam catechoat dengan rumus kimia $C_{15}H_{14}O_6$ tidak berwarna dan dalam keadaan murni sedikit tidak larut dalam air dingin tetapi sangat larut dalam air panas, larut dalam alkohol dan etil asetat, hampir tidak larut dalam kloroform, benzene dan eter. Katekin merupakan senyawa fenolik yang kompleks (polifenol) yang berkhasiat sebagai antibakteri, hemostasis, astringen dan antioksidan (Lestari *et al*, 2009). Menurut Naba'atin I dkk (2015), katekin memiliki efek antioksidan, antimutagenik, antidiabetes, antiinflamasi, antibakteri, antivirus, dan antikanker.



Gambar 2.9 Struktur kimia katekin (Sumber: saito et al, 2006)

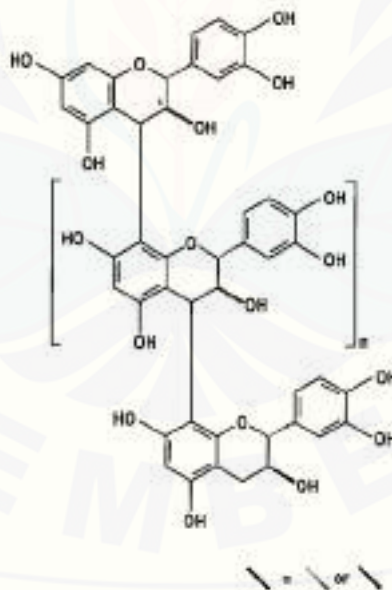
Antosianin termasuk golongan senyawa flavonoid dan merupakan kelompok terbesar pigmen alami pada tumbuhan yang larut dalam air dan bertanggung jawab untuk memberikan warna pada bunga, buah, dan sayuran. Pigmen ini bertanggung jawab terhadap timbulnya warna oranye, jingga, merah, ungu dan biru pada beberapa daun bunga dan buah (Lestario, 2011). Antosianin dapat juga bermanfaat bagi kesehatan sebagai sumber antioksidan. Hal ini disebabkan

senyawa polifenolik ini merupakan glikosida turunan polihidroksi dan polimetoksi dari 2-Phenilbenzopiriliumat atau garam flavilium) (Maulid dan Laily, 2015).



Gambar 2.10 Struktur Kimia Antosianin

Proantosiandin merupakan polimerisasi dari flavan-3-ol. Senyawa aktif ini memiliki keuntungan bagi kesehatan manusia seperti imunomodulator, antikanker, antioksidan dan antiinflamasi (Hee et al, 2008)



Gambar 2.11 Struktur Kimia Proantosiandin (Sumber: Nakamura, 2003)

2.6 Metode Ekstraksi

Ekstraksi merupakan kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair (Depkes RI, 2000). Sedangkan ekstrak merupakan sediaan kental atau cair yang didapatkan dari mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai, lalu sebagian atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa yang tersisa diperlakukan sedemikian rupa hingga memenuhi standar yang ditetapkan (Ditjen POM, 1979). Beberapa macam metode ekstraksi yang dapat digunakan, yaitu :

a. Perkolasi

Perkolasi merupakan metode ekstraksi yang dilakukan dengan cara mengalirkan cairan penyari melalui serbuk simplisia yang telah dibasahi. Prinsip dari metode perkolasi yaitu serbuk simplisia ditempatkan dalam suatu bejana silinder, yang bagian bawahnya diberi sekat pori. Cairan penyari dialirkan dari atas ke bawah melalui serbuk tersebut, cairan penyari akan melarutkan zat aktif dari simplisia hingga mencapai keadaan jenuh (Puspitasari, 2014).

b. Maserasi

Maserasi merupakan metode ekstraksi yang dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia kedalam cairan penyari. Cairan penyari menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, sehingga zat aktif terlarut dalam cairan penyari. Cairan penyari dapat berupa air, etanol, air-etanol, atau pelarut lain (Puspitasari, 2014).

c. Ekstraksi dengan gas superkritis

Ekstraksi ini menggunakan gas superkritis seperti CO₂, metode ini sering digunakan karena efisiensinya lebih baik dibandingkan berbagai metode lain walaupun metode ini membutuhkan peralatan yang cukup rumit dan mahal (Puspitasari, 2014).

d. Ekstraksi dengan menggunakan Soxhlet

Metode ekstraksi soxhlet merupakan metode yang selalu menggunakan pelarut yang baru dan umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik (Puspitasari, 2014).

2.7 Metode *Minimum Inhibition Concentration*

Dalam mengukur respon pertumbuhan populasi mikroorganisme terhadap agen antibakteri dapat menggunakan dua metode yaitu, dilusi dan difusi (Brooks et al., 2007).

1. Metode Difusi

Metode difusi adalah penentuan aktivitas mikroba berdasarkan kemampuan difusi zat antibakteri dalam lempeng agar yang telah diinokulasi dengan mikroba uji. Hasil pengamatan yang diperoleh berupa ada atau tidaknya zona hambat yang akan terbentuk di sekeliling zat antimikroba pada waktu tertentu selama masa inkubasi (Brooks et al., 2007). Pada metode ini dapat dilakukan dengan 3 cara, yaitu:

a. Cara Cakram

Metode ini sering digunakan untuk menentukan kepekaan bakteri terhadap berbagai macam obat-obatan. Pada cara ini menggunakan cakram kertas saring (paper disc) yang berfungsi sebagai tempat menampung zat antimikroba. Kertas saring tersebut diletakkan pada lempeng agar yang telah diinokulasi mikroba uji, kemudian diinkubasi pada waktu tertentu dan suhu tertentu, sesuai dengan kondisi optimum dari mikroba uji. Hasil pengamatan dapat dilihat dari zona bening di sekeliling kertas cakram tersebut. Zona bening menunjukkan suatu zona hambat yang dimiliki zat antibakteri yang diujikan (Pelczar dan Chan, 1988; Nuria et al., 2009).

b. Cara Parit

Metode ini diaplikasikan dengan membuat sebidang parit pada lempeng agar yang telah diinokulasikan bakteri uji. Parit tersebut berisi zat antimikroba, kemudian diinkubasi pada waktu dan suhu optimum yang sesuai. Hasil

pengamatan akan diperoleh ada tidaknya zona hambat di sekitar parit (Bonang, 1992).

c. Cara Sumuran

Metode sumuran didasarkan pada kemampuan senyawa antibakteri dalam menghasilkan jari-jari zona hambat di sekeliling sumuran yang telah ditambahkan zat antibakteri. Pengujian aktivitas antibakteri metode ini diawali dengan pembuatan suatu lubang yang diisi zat antimikroba. Kemudian diinkubasi pada suhu dan waktu yang sesuai dengan mikroba uji. Hasil pengamatan dengan melihat ada atau tidaknya zona hambat di sekeliling lubang sumuran (Bonang, 1992; Nurainy et al., 2008).

2. Metode Dilusi

Metode dilusi terdiri dari dua teknik pengerjaan, yaitu teknik dilusi perbenihan cair dan teknik dilusi agar yang bertujuan untuk menentukan aktivitas antimikroba secara kuantitatif (Brooks et al., 2007; Soleha, 2015;). Antimikroba dilarutkan ke dalam media agar atau kaldu yang kemudian ditanami bakteri yang akan dites. Setelah diinkubasi semalam, konsentrasi terkecil yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri disebut dengan MIC (Minimal Inhibitory Concentration). Nilai MIC dapat pula dibandingkan dengan konsentrasi obat yang didapat di serum dan cairan tubuh lainnya untuk mendapatkan perkiraan respon klinik (Pratiwi, 2008; Soleha, 2015). Macam-macam metode dilusi yaitu:

a. Dilusi Perbenihan Cair

Dilusi perbenihan cair terdiri dari makrodilusi dan mikrodilusi. Pada prinsipnya sama namun hanya berbeda dalam volume. Untuk makrodilusi volume yang digunakan lebih dari 1 ml, sedangkan mikrodilusi volume yang digunakan 0,05 ml sampai 0,1 ml (Koneman, 2006).

b. Dilusi Agar

Pada teknik dilusi agar, antibiotik sesuai dengan pengenceran akan ditambahkan ke dalam agar, sehingga akan memerlukan perbenihan agar sesuai jumlah pengenceran ditambahkan dari perbenihan agar untuk kontrol tanpa

penambahan antibiotik. Konsentrasi terendah antibiotik yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri merupakan MIC antibiotik yang diuji (Koneman, 2006).

2.8 Uji Kandungan Proantosianidin

Untuk mengetahui kandungan yang terdapat pada ekstrak kulit buah kakao adalah proantosianidin, maka digunakan uji High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) atau Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Yaitu salah satu metode analisis kimia dan fisikokimia terbaru dengan teknik kromatografi fasa gerak cairan dan fasa diam cairan atau padat (Done dkk, 1974; Snyder dan Kirkland, 1979; Hamilton dan Sewell, 1982; Johnson dan Stevenson, 1978).

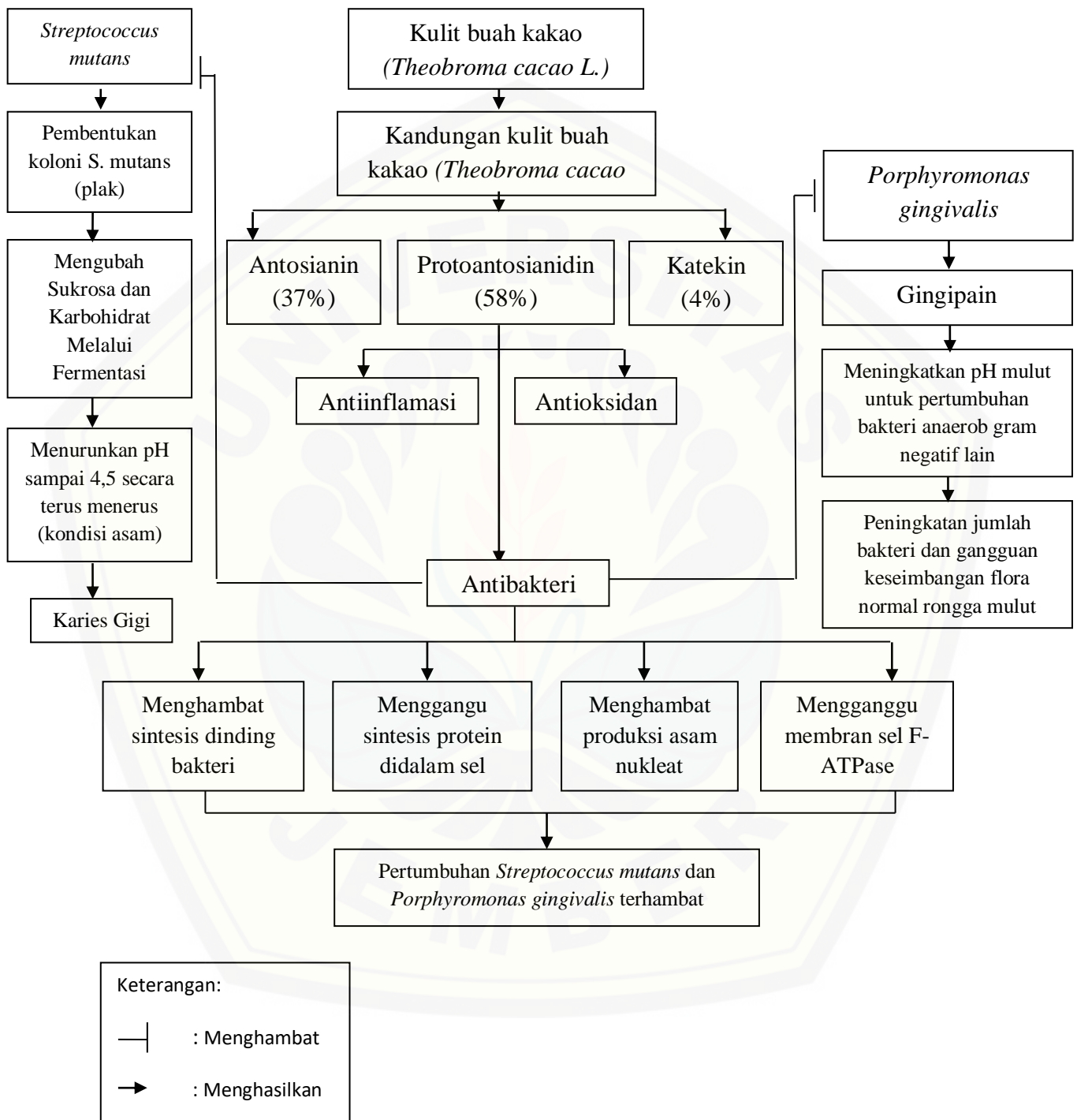
Analisis kromatografi ekstrak proantosianidin dilakukan menggunakan metode HPLC (pompa 2695, detektor dioda array 2996, Waters) digabungkan dengan kolom analitik octadecylsilane (ODS) C18 (4,6×250 mm). Kolom dioperasikan pada suhu 25° C. Senyawa terdeteksi pada panjang gelombang 200 dan 400 nm. Fase gerak HPLC terdiri dari 2% (v/v) asam asetat dalam air (eluen A) dan asam asetat 0,5% dalam air dan asetonitril (50:50, v/v; eluent B), dengan gradien linear sebagai berikut: 0–10 menit, 5–13% dari B; 10–15 menit, 13–16% B; 15–40 menit, 16–40% B; 40–43 menit, 40–43% dari B; 43–48 menit, 43–50% B; 48–58 mnt, 50–100% dari B; 58–63 mnt, 100–5% dari B (Qiang dkk., 2015).

Analisis spektrometri massa ekstrak proantosianidin kulit buah kakao dilakukan oleh Agilent 6460 triple quadrupole, spektrometer massa yang dilengkapi dengan sumber ESI (Agilent Technologies, USA) dalam mode ionisasi negatif. Tekanan nebulizer diatur ke 45 psi dan laju aliran gas pengeringan adalah 5 l/mnt. Laju aliran dan suhu gas selubung masing-masing adalah 11 l/mnt dan 350°C. Kisaran massa dari m/z 50 hingga 2000. Pemisahan kromatografi dilakukan pada kolom analitik ODS C18 (4,6 × 250 mm) menggunakan sistem Agilent 1290 Infinity HPLC (Agilent Technologies, USA). Sekitar 0,3 ml/menit eluen dimasukkan ke dalam detektor massa. *Selecting ion monitoring* (SIM) digunakan untuk memilih ion molekuler isomer dari kelompok procyanidins dalam ekstrak proantosianidin kulit buah kakao untuk kuantifikasi mereka.

Agilent Mass Hunter Workstation digunakan untuk akuisisi dan pemrosesan data (Qiang dkk., 2015).



2.9 Kerangka Konsep



Gambar 2.12 Kerangka Konsep

Penjelasan Kerangka Konsep

Terdapat empat faktor utama yang berperan dalam proses terjadinya karies, yaitu host, mikroorganisme, substrat dan waktu. Faktor-faktor tersebut bekerja bersama dan saling mendukung satu sama lain. Bakteri plak akan memfermentasikan karbohidrat dan menghasilkan asam, sehingga menyebabkan pH plak akan turun dalam waktu 1-3 menit sampai pH 4,5 dan kemudian pH akan kembali normal pada pH sekitar 7 dalam waktu 30-60 menit. Jika penurunan pH plak ini terjadi secara terus menerus maka akan menyebabkan demineralisasi pada permukaan gigi. Kondisi asam seperti ini sangat disukai oleh *S. mutans*, yang merupakan mikroorganisme penyebab utama yang berperan dalam proses terjadinya karies awal. Pertama kali akan terlihat *white spot* pada permukaan enamel, kemudian proses ini berjalan secara perlahan sehingga lesi kecil tersebut berkembang (Soesilo dkk, 2005). Pertumbuhan *S. mutans* ini perlu dihambat supaya perkembangan karies tidak berlanjut.

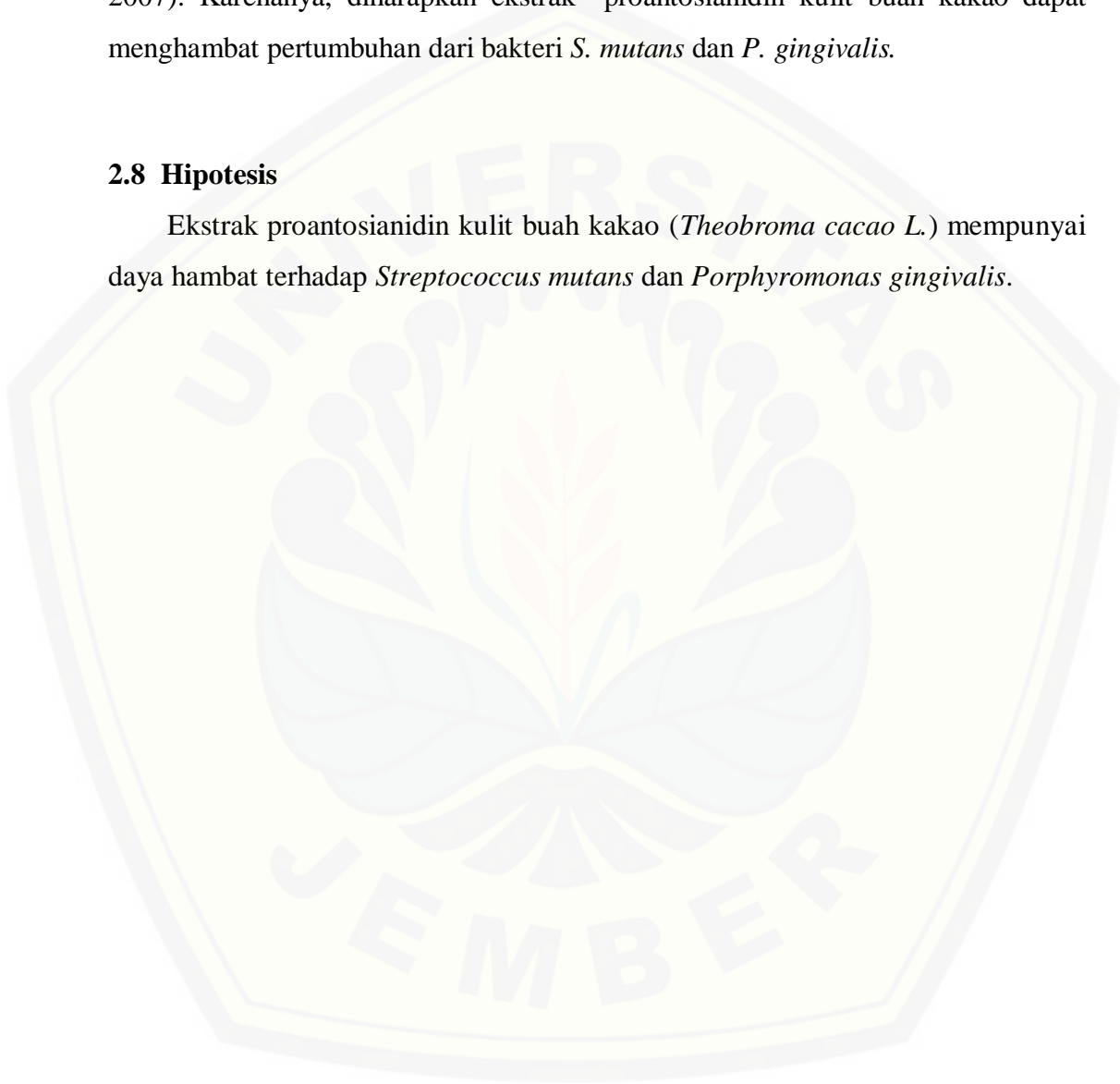
Salah satu bakteri anaerob Gram negatif yang berperan dalam pembentukan plak subgingiva adalah *P. gingivalis*. Diketahui sebagai bakteri utama yang menginduksi gingivitis dan periodontitis dengan salah satu faktor virulensi nya yaitu gingipain. Gingipain dapat merubah kondisi lingkungan mulut dengan meningkatkan pH mulut untuk pertumbuhan bakteri anaerob Gram negatif lain, sehingga terjadi peningkatan jumlah bakteri dan gangguan keseimbangan flora normal rongga mulut (Cugini dkk, 2013).

Salah satu bahan herbal yang berfungsi sebagai bahan antibakteri adalah kulit buah kakao. Pada saat panen, umumnya petani memanen biji kakao untuk diolah menjadi coklat, dan menghasilkan limbah kulit buah kakao yang cukup banyak. Keberadaan limbah tersebut sering kali tidak dimanfaatkan secara baik dan kadang dibiarkan begitu saja menjadi sampah pertanian (Harsini & Susilowati, 2010). Disisi lain, kulit buah kakao mempunyai banyak kandungan yang dapat diisolasi dan dimanfaatkan sehingga mempunyai nilai produktivitas yang tinggi. Salah satu kandungan terbesarnya yaitu polifenol yang berupa katekin (37%), antosianin (4%), dan proantosianidin (58%) (Hii *et al.*, 2009).

Proantosianidin diduga berperan sebagai antibakteri karena memiliki kemampuan penghambatan sintesis dinding bakteri, mengganggu permeabilitas membran bakteri, proses persaingan untuk mendapatkan makanan, mengganggu jalannya sintesis protein, dan penghambatan produksi asam nukleat (Brooks *et al.*, 2007). Karenanya, diharapkan ekstrak proantosianidin kulit buah kakao dapat menghambat pertumbuhan dari bakteri *S. mutans* dan *P. gingivalis*.

2.8 Hipotesis

Ekstrak proantosianidin kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) mempunyai daya hambat terhadap *Streptococcus mutans* dan *Porphyromonas gingivalis*.



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimental laboratoris, yaitu penelitian dengan melakukan percobaan (*experiment*) yang bertujuan mengetahui pengaruh yang timbul akibat adanya perlakuan terhadap variabel yang diteliti. Penelitian ini dilakukan dan diteliti di laboratorium (Notoatmodjo, 2010).

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *The One Shot Case Study*, dimana penelitian yang terdiri dari kelompok yang diberi perlakuan/*treatment* yang kemudian hasilnya diobservasi (Notoatmodjo, 2012).

3.3 Sampel Penelitian

Sampel penelitian yang digunakan adalah ekstrak proantosianidin kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*). Mikroorganisme yang digunakan adalah bakteri *S. mutans* dan *P. gingivalis*. Sampel *S. Mutans* dibagi dalam 6 kelompok perlakuan dan 1 kontrol pertumbuhan, diantaranya:

- a. Kelompok 1 : Ekstrak proantosianidin kulit buah kakao dengan konsentrasi 32 mg/ml.
- b. Kelompok 2 : Ekstrak proantosianidin kulit buah kakao dengan konsentrasi 16 mg/ml.
- c. Kelompok 3 : Ekstrak proantosianidin kulit buah kakao dengan konsentrasi 8 mg/ml.
- d. Kelompok 4 : Ekstrak proantosianidin kulit buah kakao dengan konsentrasi 4 mg/ml.
- e. Kelompok 5 : Ekstrak proantosianidin kulit buah kakao dengan konsentrasi 2 mg/ml.

- f. Kelompok 6 : Ekstrak proantosianidin kulit buah kakao dengan konsentrasi 1 mg/ml.
- g. Kontrol : Larutan BHIB dengan media cair bakteri *S. mutans*.

Sampel *P. Gingivalis* dibagi dalam 6 kelompok perlakuan dan 1 kontrol pertumbuhan, diantaranya:

- a. Kelompok 1 : Ekstrak proantosianidin kulit buah kakao dengan konsentrasi 16 mg/ml.
- b. Kelompok 2 : Ekstrak proantosianidin kulit buah kakao dengan konsentrasi 8 mg/ml.
- c. Kelompok 3 : Ekstrak proantosianidin kulit buah kakao dengan konsentrasi 4 mg/ml.
- d. Kelompok 4 : Ekstrak proantosianidin kulit buah kakao dengan konsentrasi 2 mg/ml.
- e. Kelompok 5 : Ekstrak proantosianidin kulit buah kakao dengan konsentrasi 1 mg/ml.
- f. Kelompok 6 : Ekstrak proantosianidin kulit buah kakao dengan konsentrasi 0,5 mg/ml.
- g. Kontrol : Larutan BHIB dengan media cair bakteri *P. gingivalis*.

3.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, identifikasi kulit buah kakao dilakukan di Laboratorium Tanaman Politeknik Negeri Jember dan pembuatan ekstrak proantosianidin kulit buah kakao dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember. Penelitian dilakukan pada bulan Agustus 2018 sampai dengan selesai.

3.5 Variabel Penelitian

A. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak kulit buah kakao dengan konsentrasi 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 4 mg/ml, 8 mg/ml, 16 mg/ml, dan 32 mg/ml.

B. Variabel Terikat

- a. Daya hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*
- b. Daya hambat pertumbuhan bakteri *Porphyromonas gingivalis*

C. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah media pertumbuhan *S. mutans*, suspensi *S. mutans* media pertumbuhan *P. gingivalis*, suspensi *P. gingivalis*, kriteria kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*), cara ekstraksi kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*), metode dan cara kerja.

3.6 Definisi Operasional

A. Ekstrak proantosianidin kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*)

Ekstrak dalam bentuk sediaan cair yang merupakan hasil ekstraksi dari kulit buah kakao varietas lindak menggunakan metode maserasi. Pada penelitian ini dibuat pengenceran konsentrasi ekstrak proantosianidin kulit buah kakao dengan konsentrasi 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 4 mg/ml, 8 mg/ml, 16, dan 32 mg/ml.

B. Daya hambat ekstrak proantosianidin kulit buah kakao terhadap pertumbuhan *S. mutans* dan *P. gingivalis*

Daya hambat ekstrak proantosianidin adalah kemampuan ekstrak proantosianidin kulit buah dalam menghambat pertumbuhan *S. mutans* dan *P. gingivalis*. Uji daya hambat dilakukan dengan pengamatan secara visual perubahan warna dan kekeruhan media cair BHI-B pada tabung reaksi yang telah diuji menggunakan metode *serial dilution*, diinkubasi selama 24 jam pada

suhu 37°C. Tabung yang tampak jernih dan tidak terjadi perubahan warna menunjukkan terhambatnya pertumbuhan *S. mutans* dan *P. gingivalis*, sedangkan tabung yang keruh dan terjadi perubahan warna menunjukkan pertumbuhan *S. mutans* dan *P. gingivalis*.

C. Uji MIC ekstrak proantosianidin kulit buah kakao terhadap pertumbuhan *S. mutans* dan *P. gingivalis*

Uji MIC merupakan uji yang dilakukan untuk mengetahui konsentrasi terendah dari ekstrak proantosianidin kulit buah kakao yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. mutans* dan *P. gingivalis* setelah di inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. MIC bakteri ditetapkan dengan melihat perubahan warna dan kekeruhan pada tabung reaksi yang dibandingkan dengan tabung reaksi sebelum diinkubasi 24 jam. Perubahan warna dan kekeruhan pada media BHI-B menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri.

3.7 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung reaksi, tabung Erlenmeyer, *autoclave*, *incubator*, pipet mikroliter, rak tabung reaksi, corong, *shaker*, neraca digital, dan gelas ukur.

Sedangkan bahan yang digunakan adalah 5 kilogram kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) dengan jenis Lindak, aquadest steril, *Streptococcus mutans* ATCC 33277, *Porphyromonas gingivalis*, *Brain Hearth Infusion Broth* (BHI-B), Pelarut N-Heksana 5 liter

3.8 Prosedur Penelitian

A. Uji identifikasi kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*)

Kulit buah Kakao yang digunakan dalam penelitian ini terlebih dahulu dilakukan uji identifikasi untuk mengetahui bahwa kulit buah kakao yang digunakan berasal dari buah kakao dengan spesies *Theobroma cacao L.* Uji

identifikasi ini dilakukan di Laboratorium Tanaman Politeknik Negeri Jember. Kulit buah kakao yang digunakan adalah semua bagian kulit segar dengan jenis kakao lindak (Forastero).

B. Tahap Pembuatan Ekstrak Proantosianidin Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*)

1. Kriteria kulit buah kakao

Kriteria kulit buah kakao yang dipakai adalah spesies *Theobroma cacao L.* dengan jenis kakao lindak (forastero). Bagian yang digunakan dari kulit buah kakao yaitu semua bagian kulit yang segar dan masak.

2. Prosedur ekstraksi maserasi

Buah kakao sebanyak lima kilogram dibersihkan dari kotoran yang menempel, lalu dikupas. Kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) dipotong dan dijemur sampai kering selanjutnya dilakukan penyerutan sampai terbentuk serutan-serutan halus. Hasil serutan diblender hingga mendapatkan serbuk halus dan ditimbang. 100 gram bubuk kulit buah kakao dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 700 ml larutan aseton 70% dan 300 ml akuades, kemudian diaduk sampai homogen dan dimasukkan ke dalam *waterbath shaker* dengan suhu 50°C selama 20 menit. Larutan ekstrak dipisahkan dari supernatannya dengan cara sentrifugasi kecepatan 2000 rpm selama 10 menit. Larutan ekstrak kemudian dimasukkan kedalam *rotavapor*, setelah itu dipindahkan ke dalam cawan petri dan dimasukkan ke dalam oven. Cawan petri dikeluarkan dari oven, kemudian bagian yang kental yang berada di dasar cawan petri diambil dan diletakkan di gelas kimia (Wissam, 2013).

C. Uji Terhadap Bakteri *S. mutans* dan *P.gingivalis*

a. Uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC)

Uji MIC ekstrak proantosianidin kulit buah kakao terhadap pertumbuhan *S. mutans* dan *P.gingivalis* menggunakan metode dilusi cair atau *serial dilution*. Konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini adalah 1 mg/ml, 2 mg/ml, 4 mg/ml, 8 mg/ml, 16 mg/ml dan 32 mg/ml pada *S. mutans*. Sedangkan pada *P.*

gingivalis dengan konsentrasi 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 4 mg/ml, 8 mg/ml dan 16 mg/ml.

b. Persiapan Media Blood Heart Infusion-Broth (BHI-B)

BHI-B adalah media penyubur dalam bentuk cair untuk pertumbuhan bakteri yang digunakan dalam pembuatan suspensi. BHI-B sebanyak 3,7 gram ditimbang menggunakan neraca dan mengukur akuadest steril sebanyak 100 ml dengan gelas ukur. BHI-B dan akuades steril dimasukkan dalam tabung erlenmeyer dan diaduk dengan spatula kemudian dipanaskan di atas kompor sampai mendidih dan homogen. Setelah itu, ditutup dengan kapas dan disterilkan dalam autoclave dengan suhu 121°C selama 15 menit (Hadioetomo, 1993).

c. Pembuatan Suspensi *S. Mutans*

Pembuatan suspensi *Streptococcus mutans* dengan mencampur 2 ml larutan BHI-B steril ke tabung reaksi kemudian ditambahkan 1 ose *S. mutans* dengan melewati di atas lampu spiritus, lalu dimasukkan ke dalam desikator dan diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam. Pertumbuhan *S. mutans* ditandai dengan adanya kekeruhan pada media.

d. Pembuatan suspensi *Porphyromonas gingivalis*

Pembuatan suspensi *Porphyromonas gingivalis* dengan mencampur 2 ml larutan BHI-B steril ke tabung reaksi kemudian ditambahkan 1 ose *P. gingivalis* dengan melewati di atas lampu spiritus, lalu dimasukkan ke dalam desikator dan diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam. Pertumbuhan *P. gingivalis* ditandai dengan adanya kekeruhan pada media (Rahim dan Khan, 2006).

e. Prosedur *Serial Dilution* Pada Bakteri *S. mutans*

1. Tabung steril disiapkan.
2. Tabung 1 diisi 64 mg/ml ekstrak proantosianidin, ditambah 1 mL BHIB, ditambah 1 mL bakteri *S. mutans* (Konsentrasi 32 mg/ml).

3. Tabung 2 diisi 32 mg/ml ekstrak proantosianidin, ditambah 1 mL BHIB, ditambah 1 mL bakteri *S. mutans* (Konsentrasi 16 mg/ml).
4. Tabung 3 diisi 16 mg/ml ekstrak proantosianidin, ditambah 1 mL BHIB, ditambah 1 mL bakteri *S. mutans* (Konsentrasi 8 mg/ml).
5. Tabung 4 diisi 8 mg/ml ekstrak proantosianidin, ditambah 1 mL BHIB, ditambah 1 mL bakteri *S. mutans* (Konsentrasi 4 mg/ml).
6. Tabung 5 diisi 4 mg/ml ekstrak proantosianidin, ditambah 1 mL BHIB, ditambah 1 mL bakteri *S. mutans* (Konsentrasi 2 mg/ml).
7. Tabung 6 diisi 2 mg/ml ekstrak proantosianidin, ditambah 1 mL BHIB, ditambah 1 mL bakteri *S. mutans* (Konsentrasi 1 mg/ml).
8. Tabung 7 diisi 1 mL BHIB, ditambah 1 mL bakteri *S. mutans* sebagai kontrol pertumbuhan.

Masing-masing tabung ditambahkan suspensi bakteri *S. mutans* dengan tingkat kekeruhan $1,5 \times 10^8$ CFU/ mL McFarland. Ketujuh tabung ini kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Kemudian dilihat konsentrasi terendah dimana tidak terdapat pertumbuhan bakteri ditandai dengan tidak adanya kekeruhan pada tabung reaksi. Pengulangan uji MIC ekstrak proantosianidin kulit buah kakao terhadap bakteri *S. mutans* dilakukan sebanyak 3 kali.

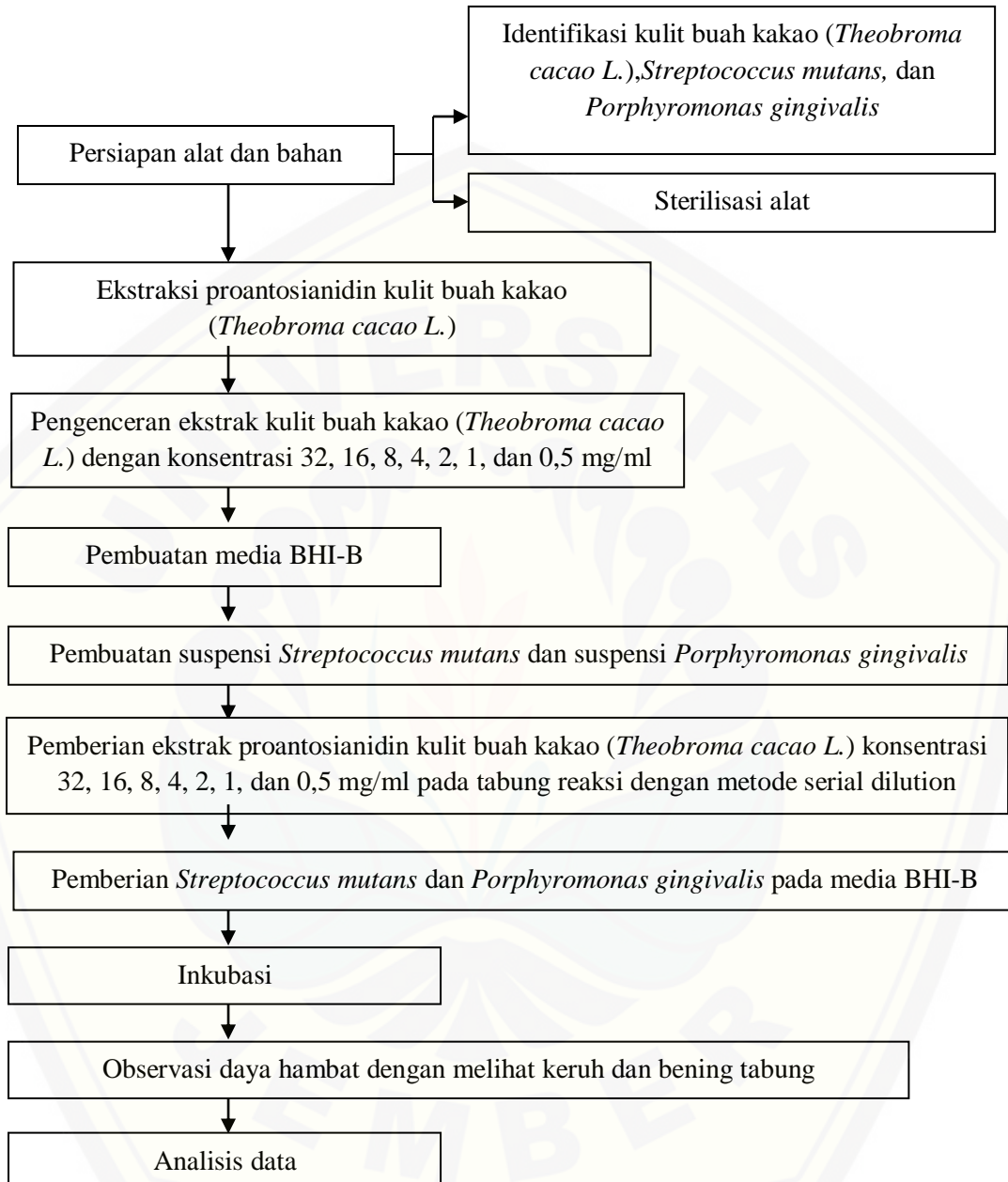
f. Prosedur *Serial Dilution* Pada Bakteri *P. gingivalis*

1. Tabung steril disiapkan.
2. Tabung 1 diisi 32 mg/ml ekstrak proantosianidin, ditambah 1 mL BHIB, ditambah 1 mL bakteri *P. gingivalis* (Konsentrasi 16 mg/ml).
3. Tabung 2 diisi 16 mg/ml ekstrak proantosianidin, ditambah 1 mL BHIB, ditambah 1 mL bakteri *P. gingivalis* (Konsentrasi 8 mg/ml).
4. Tabung 3 diisi 8 mg/ml ekstrak proantosianidin, ditambah 1 mL BHIB, ditambah 1 mL bakteri *P. gingivalis* (Konsentrasi 4 mg/ml).
5. Tabung 4 diisi 4 mg/ml ekstrak proantosianidin, ditambah 1 mL BHIB, ditambah 1 mL bakteri *P. gingivalis* (Konsentrasi 2 mg/ml).

6. Tabung 5 diisi 2 mg/ml ekstrak proantosianidin, ditambah 1 mL BHIB, ditambah 1 mL bakteri *P. gingivalis* (Konsentrasi 1 mg/ml).
7. Tabung 6 diisi 1 mg/ml ekstrak proantosianidin, ditambah 1 mL BHIB, ditambah 1 mL bakteri *P. gingivalis* (Konsentrasi 0,5 mg/ml).
8. Tabung 7 diisi 1 mL BHIB, ditambah 1 mL bakteri *P. gingivalis* sebagai kontrol pertumbuhan.

Masing-masing tabung ditambahkan suspensi bakteri *P. gingivalis* dengan tingkat kekeruhan $1,5 \times 10^8$ CFU/ mL McFarland. Ketujuh tabung ini kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Kemudian dilihat konsentrasi terendah dimana tidak terdapat pertumbuhan bakteri ditandai dengan tidak adanya kekeruhan pada tabung reaksi. Pengulangan uji MIC ekstrak proantosianidin kulit buah kakao terhadap bakteri *P. gingivalis* dilakukan sebanyak 3 kali.

3.9 Alur Penelitian



3.10 Analisis Data

Pada penelitian ini, variabel data baik variabel bebas maupun terikat termasuk dalam skala nominal. Analisis data yang digunakan menggunakan uji *Chi-Square* (X^2), dimana untuk mengetahui ada atau tidaknya korelasi.



BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa proantosianidin kulit buah kakao memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri *S. mutans* dengan MIC 16 mg/ml dan *P. gingivalis* dengan MIC 8 mg/ml.

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan pada penelitian ini adalah:

- a. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan konsentrasi ekstrak proantosianidin kulit buah kakao yang lebih besar, apakah dapat membunuh bakteri *S. mutans* dan *P. gingivalis* atau mikroflora patogen rongga mulut lainnya.
- b. Perlu dilakukan uji toksisitas ekstrak proantosianidin kulit buah kakao terhadap *S. mutans* dan *P. gingivalis*.
- c. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai uji biokompatibilitas ekstrak proantosianidin kulit buah kakao terhadap jaringan rongga mulut agar dapat diaplikasikan secara nyata sebagai medikamen di bidang kedokteran gigi.
- d. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan metode yang berbeda untuk mengetahui perbandingan keefektifitasan metode yang digunakan.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2009. Menggali Potensi Jember. [serial online] <http://talentapendidikan.blogspot.com/2009/01/menggali-jember.html> [14 Januari 2013].
- Ari A, Andian. (2008). Bahan Ajar Kimia Dasar. Universitas Negeri Yogyakarta.
- Kusumawardani B, Soesatyo MHNE, Dasuki D, Asmara W. *Porphyromonas gingivalis bacteremia induces intrauterine growth restriction in pregnant rats*. Proceeding RDM&E-V2011;107-116.
- Belli, W.A., Buckley, D.H., and Marquis, R.E. 1995. *Weak acid effects and fluoride inhibition of glycolysis of Streptococcus mutans GS-5*. Can. J. Microbiol. 41: 785–791.
- Bidarisugma, Timur, Purnamasari. 2012. Antibodi monoklonal S.mutans 1 © 67 kDa sebagai Imunisasi Pasif dalam Alternatif Pencegahan Karies Gigi secara Topical. BIMKES: 1(1).
- Bodet, C., Chandad, F. and Grenier, D. 2006a. Anti-inflammatory activity of a high-molecular-weight cranberry fraction on macrophages stimulated with lipopolysaccharides from periodontopathogens. *J Dent Res* 85, 235– 239.
- Bodet, C., Piche, M., Chandad, F. and Grenier, D. 2006b. Inhibition of periodontopathogen-derived proteolytic enzymes by a high-molecular-weight fraction isolated from cranberry. *J Antimicrob Chemother* 57, 685– 690.
- Bonang G. 1992. Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan Edisi 16. Jakarta : Buku Kedokteran EGC.
- Brooks, F., Butel, J.S., dan Morse, S.A. 2008. Mikrobiologi Kedokteran: Jawetz, Melnick, & Adelberg. Edisi 23. Jakarta: EGC.
- Brooks, G. F., Butel, J. S., dan Morse, S. A. 2007. Mikrobiologi Kedokteran Jawetz, Melnick, and Adelberg. 23th edition. Jakarta: EGC.
- Carranza, Newman, Takei, dan Klokkevold. 2006. *Clinical Periodontology*. 10th edition. Philadelphia: WB Saunders.
- Chira et al. Grape variety effect on proanthocyanidin composition and sensory perception of skin and seed tannin extracts from bordeaux wine grapes (cabernet sauvignon and merlot) for two consecutive vintages. 2009, 57(2): 545-553.

- Cugini, C., Klepac-Ceraj, V., Rackaityte, E., Riggs, J. E., Davey, M. E. 2013. *Porphyromonas gingivalis*: keeping the pathos out of biont. *Journal of Oral Microbiology*, 5(1). 19804.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia (Depkes RI). 2000. Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. Jakarta: Bakti Husada.
- Ditjen POM Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1979. Farmakope Indonesia. Edisi III. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Dworkin, Falkow, Eugene, Scheilefer, dan Stackebrandt. 2006. *The Prokaryotes Third Edition A Handbook In The Biology Of Bacteria*. London: Springer
- Ermawati, Tantin. 2015. Potensi Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta (*C. robusta*) Terhadap Ekspresi TNF- α Pada Tikus Periodontitis Yang Diinduksi *Porphyromonas gingivalis*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Fapohunda & Afolayan, 2012, Fermentation of Cocoa Beans and Antimicrobial Potentials of the pod Husk Phytochemicals, *Journal of Physiology and Pharmacology Advances*, 2(3), 158-164.
- Ferrazzano, G. F., Amato, I., Ingenito, A., Natale, A. D., & Antonino P., 2009, Anti-Cariogenic Effects of Polyphenols from Plant Stimulant Beverages (Cocoa, Coffee, Tea), *Fitoterapia*, 80, 255-262.
- Figueira, A., and Janick, J., 1993, New products from *Theobroma cacao*: Seed pulp and pod gum. *New crops.*, New York, 475478.
- Feldman, M., Weiss, E., Shemesh, M., Ofek, I., Bachrach, G., Rozen, R. and Steinberg, D. 2009. Cranberry constituents affect fructosyltransferase expression in *Streptococcus mutans*. *Altern Ther Health Med* **15**, 32– 38.
- Feldman, M., Weiss, E.I., Ofek, I., Shemesh, M. and Steinberg, D. 2010. In vitro real-time interactions of cranberry constituents with immobilized fructosyltransferase. *J Med Food* **13**, 1153– 1160.
- Forssten, S. D., Bjorklund, M., & Ouwehand, A.C., 2010, *Streptococcus mutans*, Caries and Simulation Models, *Nutrients Journal*, 2, 290-298.
- Hadioetomo, R.S. 1993. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama. 34-36.
- Harsini T & Susilowati (2010). Pemanfaatan kulit buah kakao dari limbah perkebunan kakao sebagai bahan baku pulp dengan proses organosolv. *J Ilmiah Teknik Lingkungan* 2 (2), 80-89.
- Hawley, R., 2003, *Enterotoxigenic Escheri-chia coli*, di akses tanggal 26 Agustus 2018 dari <http://vm.cfsan.fda.gov/mov/chap14.html>.

- Helmenstein AM (2010). Theobromine Chemistry: Theobromine is Chocolate's Caffeine Relative. Taken from [http://chemistry.about.com/od/facts/structures/a/theobrominechemistry.htm], 6 Mei 2010.
- Hii, C. L., Law, C. L., Suzannah, S., Misnawi, & Cloke, M., 2009, *Polyphenols in cocoa (Theobroma cacao L.)*, *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 2, 04, 702-722.
- Houle M.A. 2003. *The collagenase activity of Porphyromonas gingivalis is due to Arg-gingipain*. FEMS Microbiol.
- Ide, P. 2008. *Dark Chocolate Healing Mengungkap Kasiat Coklat terhadap Sirkulasi Darah dan Imunitas Tubuh*. Jakarta: PT Elex Media Komputindo.
- Johnson, E. L. and Stevenson, R (1978). Basic liquid chromatography. Varian, California.
- Karnawati E. 2010. *Budidaya dan Pasca Panen KAKAO*.
- Kartika, C. 2015. Daya Hambat Ekstrak Kulit Buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*) terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans*. Skripsi. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. 9-18.
- Komisi Kakao Indonesia. 2006. *Direktori dan Revitalisasi Agribisnis Kakao Indonesia*. Departemen Pertanian. 248.
- Kunkel, Dennis Microscopy Inc. *Streptococcus mutans*. <http://www.denniskunkel.com/detail/9571.html>. [12 Juni 2017].
- La, V.D., Howell, A.B. and Grenier, D. 2010. Anti-*Porphyromonas gingivalis* and anti-inflammatory activities of A-type cranberry proanthocyanidins. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 1778–1784
- Lee, Lin, Chia, Hsieh, Chen, Lin & Lan. 2006. Bactericidal Effects of Diode Laser of *Streptococcus mutans* After Irradiation Through Different Thickness of Dentin. *Lasers in Surgery and Medicine*. Vol 38: 62-69.
- Lemos, Quivey, H K, J. A. *Streptococcus mutans*: a new Gram-positive paradigm. *Microbiology* 2013; 159(3):436-45.
- Lestari C, Widijijono, Murdiastuti K. 2009. *Pengaruh Ekstrak Gambir Terstandarisai (Uncaria gambir (Hunter) Roeb) Sebagai Periodontal Dressing Terhadap Penyembuhan Luka Ginggiva Kelinci (Oryctolagus cuniculus)*. *Majalah Kedokteran Gigi* Vol.16(1):8.
- Lestario LN, Rahayuni E Dan Timotius KH. 2011. *Kandungan Antosianin Dan Identifikasi Antosianidin Dari Kulit Buah Jenitri (Elaeocarpus angustifolius Blume)*. *Agritech*. Vol.3 (2).

- Lewis, A. J. ; Southern, L. L., 2001. Swine nutrition. 2nd edition - CRC Press.
- Lindsay, S. 1992. High performance liquid chromatography. Second edition. John Wiley & Sons, Chischester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore.
- Lisan, FR. 2015. Penentuan jenis tanin secara kualitatif dan penetapan kadar tanin dari serabut kelapa (*Cocos nucifera* L.) secara permanganometri. *Calyptra: jurnal ilmiah mahasiswa universitas surabaya* 4(1): 1-16.
- Madigan, M. T. 2003. Biology of Microorganism. Ten Edition. USA: Pearson Education Inc.
- Makkar H.P.S. 2003. *Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds*, Animal Production and Health Section, Joint FAO/IAEA Division. International Atomic Energy Agency. Vienna, Austria.
- Maulid RR Dan Laily AN. 2015. Kadar Total Pigmen Klorofil Dan Senyawa Antosianin Ekstrak Kastuba (*Euphorbia Pilcherrima*) Berdasarkan Umur Daun. Malang: Universitas Islam Negeri.
- Mealey, B.L., Perry, R.K., 2006. Periodontal medicine: Impact of periodontal infection on systemic health. In: Carranza's clinical periodontology 10th ed. Philadelphia: W.B Saunder Company, h.312-29.
- MicrobeWiki. 2010. [Online] *Porphyromonas*.<http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Porphyromonas>. [27 April 2011]
- Miranti, M., Prasetyorini dan Suwary, C., 2013, Perbandingan aktivitas antibakteri ekstrak etanol 30% dan 96% kelopak bunga rosella (*Hibiscus Sabdariffa*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Ekologia*, 13(1): 9-18.
- Miyazaki, A. Yamaguchi, T. Yamamoto, M. Itabe, H. Suzuki, K. 2011. Oxidized Lowdensity Lipoprotein-Induced Periodontal Inflammation Is Associated With The Upregulation Of Cyclooxygenase-2 And Microsomal Prostaglandin Synthase 1 In Human Gingival Epithelial Cells. *Biochemical And Biophysical Research Communications* Vol. 413: 566-571
- Mulyatni, A. S. Budiani, A. dan Taniwiryo, D. 2012. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) Terhadap *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, dan *Staphylococcus aureus*. *Menara Perkebunan*, 80 (2): 77-84.
- Naba'atin I, Melok AW, Happy H. Penambahan Ekstrak kulit buah kakao (*theobroma cacao* L.) pada periodontal dressing terhadap kepadatan kolagen luka ginggiva kelinci. *BIMKGI* 2015; Vol.3; No.2; (29).

- Naim, R. 2004. *Senyawa Antimikroba Dari Tanaman*. IPB.(<http://kompas.com>). Diakses 01 Maret 2012.
- Nakamura Y, Tsuji S, dan Tonogai Y.2003. *analysis of proanthocyanidins in grape seed extract, healt foods and grape seed oils*. Journal of health science. 49(1): 45-54.
- Notoatmodjo, S. 2010. Metodologi Penelitian Kesehatan. Cetakan III. Jakarta: PT. Rineka Cipta.
- Notoatmodjo, S. 2012. Metodologi Penelitian Kesehatan. Cetakan III. Jakarta: PT. Rineka Cipta.
- Nuria, M. C., A. Faizatun, dan Sumantri. 2009. Uji antibakteri ekstrak etanol daun jarak pagar (*Jatropha curcas* L) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, dan *Salmonella typhi* ATCC 1408. Jurnal Ilmu - ilmu Pertanian. 5: 26 - 37.
- Pambayun, Gardjito, Sudarmadji, Rahayu. 2008. Sensitivitas Bakteri Gram Positif terhadap Katekin yang Diekstraksi dari Gambir (*Uncaria gambir*). Agritech.28(4).
- Pelczar, M.J., Chan. E.C.S, and Pelczar, M.F., 1988, Dasar-Dasar Mikrobiologi Jilid 2, (diterjemahkan oleh Hadioetomo, R.S. dkk.), Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta.
- Pratiwi, D. 2007. Merawat Gigi Sehari – hari. Jakarta: Penerbit Buku Kompas.
- Priyanto.2010. Farmakologi Dasar Untuk Mahasiswa Farmasi dan Keperawatan. Edisi Kedua. Jakarta: Leskonfi.
- Putra, A.H. 2016. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Kamboja Putih (*Plumeria acuminata*) terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans*.Skripsi. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Puspitasari, L., D.A. Swastini dan C.I.A. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol 95% Kulit Buah Manggis (*Garcinia Mangostana* L.). Jurnal Farmasi Udayana. 1-5
- Putri, M.H., Herijulianti, E., dan Nurjannah, N. 2010. Ilmu Pencegahan Penyakit Jaringan Keras dan Jaringan Pendukung Gigi. Jakarta: EGC.
- Purwandani, S.N. & Rahayu, E.S. 2003.Isolasi dan Identifikasi *Lactobacillus* yang Berpotensi sebagai Agensia Probiotik.Agritech. Vol. 23(2): 67-64.
- Radji, Maksum. 2016. Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran. 9(2): 23-25; 29-31.

- Regina, R. A. 2007. The effect of mouthwash containing cetylpyridinium chloride on salivary level of *Streptococcus mutans*. *Journal PDGI*. 57(1): 19-24.
- Rindit, P., Gardjito, M., Sudarmadji, S. & Rahayu, K. 2008. Sensitivitas Bakteri Gram Positif Terhadap Katekin yang Diekstraksi dari Gambir (*Uncaria gambir*). *J. Agritech*. Vol.28(4): 174-179.
- Robinson, Trevor. Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi. Alih bahasa: Padmawinata, K. dari *The Basic of Higher Plants* 6 th Ed. Bandung: ITB. 1995.
- Sahardi, Fadju D. *Keragaman karakteristik morfologis dan agromonomis plasma nutfah klon harapan kakao lokal sulawesi selatan*. *Litri*. 21 (3) 2015, 147.
- Saito ST, Albert W, Edna SS, And Francie Bueno. "A Method For Fast Determination Of Epigallocatechin Gallate (EGCG), Epicatechin (EC), Catechin (C) And Caffeine (CAF) In Green Tea Using HPLC". *Ciencia E Tecnologia De Alimentos*, Vol. 26, No. 2, Pp. 394-400, 2006.
- Samaranayake, L. P. 2002. *Essential Microbiology For Dentistry*. Philadelphia: W. B. Saunders Company.
- Samaranayake, L.P. 2012. *Essential Microbiology for Dentistry*. Fourth Edition. Oxford: Elsevier.
- Sartini, Djide, Natsir, M., & Alam, G., 2011, Ekstraksi Komponen Bioaktif Dari Limbah Kulit Buah Kakao Dan Pengaruhnya Terhadap Aktivitas Antioksidan Dan Antimikroba, *Journal of Traditional Medicine*, 14 (47).
- Simon, L. 2007. The Role of *Streptococcus mutans* and Oral Ecology in the Formation of Dental Caries. [serial online] <http://www.jyi.org/issue/therole-of-streptococcus-mutans-and-oral-ecology-in-the-formation-ofdental-caries/>. [12 Juni 2017].
- Sinaga Anni. Faktor-faktor yang berhubungan dengan perilaku ibu dalam mencegah karies gigi anak usia 1-5 tahun di Puskesmas Babakan Sari Bandung 2013, Hal 13.
- Siqueira, J. F & Rocas, I. N. 2007. *Bacterial Pathogenesis and Mediators in Apical Periodontitis*. *Brazilian Dental Journal*. Vol. 18(4).
- Snell, Richard S. *Anatomi Klinik* ed. 6. EGC : Jakarta. 2006.
- Snyder, L. R and Kirkland J.J. 1979. *Introduction to modern liquid chromatography*. second edition. John Wiley & Sons. Inc New York, Chischer, Brisbane, Toronto, Singapore.


- Soesilo, D., Santoso, Rinna, E., Diyatri, I. 2005. Peranan Sorbitol dalam Mempertahankan Kestabilan pH Saliva pada Proses Pencegahan Karies. *J.Dent.* 38 (1): 25-28.
- Soleha, T. 2015. Uji Kepekaan terhadap antibiotik. Universitas Lampung. Lampung.
- Sri-Mulato, Widyotomo, S., Misnawi, & Suharyanto, E. (2005). *Pengolahan Produk Primer dan Sekunder Kakao. Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia.* Jember.
- Sukanto, S. 2013. Pengendalian secara hayati penyakit busuk buah kakao dengan jamur antagonis *Trichoderma harzianum*. Seminar Ilmiah dan Kongres Nasional PFI XVI Bandung, 6-8 Agustus 2013.
- Sumanti V, Widarsa T, Duarsa DP. Faktor yang berhubungan dengan partisipasi orangtua dalam perawatan kesehatan gigi anak di puskesmas Tangallalang I. *Yogyakarta: Public Health and Preventive Archive* 2013; 1(1): 19-20.
- Susanto, FX. 1994. *Tanaman Kakao Budidaya dan Pengolahan Hasil.* Yogyakarta: Kaninus.
- Steinberg, D., Feldman, M., Ofek, I. and Weiss, E.I. 2004. Effect of a high-molecular-weight component of cranberry on constituents of dental biofilm. *J Antimicrob Chemother* 54, 86– 89.
- Suwandi, U. 1992. Mekanisme Kerja Antibiotik. Cermin Dunia Kedokteran No. 76. Jakarta: Pusat Penelitian dan Pengembangan PT. Kalbe Farma.
- Taringan, Rasinta. 2014. Karies gigi, penerbit buku kedokteran EGL, Jakarta.
- Tjitrosoepomo, G. 2007. *Taksonomi Tumbuhan (Spermatohyta).* Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Todar, K. 2008. The Normal Bacterial Flora of Humans. University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology.
- Toni, H. 1997. Atlas Berwarna Mikrobiologi Kedokteran. Jakarta: Hipokrates.
- Wahyudi, T. dan Pujianto. 2015. Kakao: Sejarah, Botani, Proses Produksi, Pengolahan dan Perdagangan. Yogyakarta: UGM Press.
- Wahyukundari, M.H. 2008. Perbedaan Kadar Matix Metalloproteinase-8 Setelah Scaling dan Pemberian Tetrasiklin pada Penderita Periodontitis Kronis. Departemen Periodonsia Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya-Indonesia.
- Winn, Washington and Elmer W. Koneman. 2006. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.* 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 12 September 2008.

World Health Organization, Centers for Disease and Control Prevention.
Worldwide Prevalence of Anaemia 1993-2005. 2008. ISBN 978 92 4
159665 7.



LAMPIRAN

Lampiran A. Surat Penelitian di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember



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


Nomor : 2048 /UN25.8.TL/2018
Perihal : Ijin Penelitian


Kepada Yth.
Kepala Laboratorium Biomedik
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
di
Jember

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

1	Nama	: Ibnu Satria
2	NIM	: 151610101022
3	Semester/Tahun	: 2017/2018
4	Fakultas	: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
5	Alamat	: Jl. Danau Toba gang 7 nomor 27
6	Judul Penelitian	: Duya hambat ekstrak proantosianidin kulit buah kakao (<i>Theobroma cacao L.</i>) terhadap streptococcus mutans dan porphyromonas gingivalis melalui uji <i>minimum inhibition concentration</i>
7	Lokasi Penelitian	: Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
8	Data/alat yang dipinjam	: -
9	Waktu	: Agustus 2018 s/d Selesai
10	Tujuan Penelitian	: Pengkulturan, Pembuatan Suspensi Bakteri Porphyromonas Gingivalis dan Streptococcus mutans, dan uji <i>minimum inhibition concentration</i>
11	Dosen Pembimbing	: 1. drg. Yani Corvianindya Rahayu M.KG, 2. drg. Pujana Endah Lestari M.kes.

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih

Jember 14 AUG 2018
Dekan
Wakil Dekan I,

Dr. drg. IDA Susilawati, M.Kes
NIP. 196109031986022001



Lampiran B. Surat Ijin Penelitian di Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember

	KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI UNIVERSITAS JEMBER FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI Jl. Kaliraman No. 37 Jember ☎(0331)333536, Fax. 333993	
Nomor	: 157 /UN25.8.TL/2018	12 4 MAY 2018
Perihal	: Pembuatan Ekstrak	
<p>Kepada Yth Kepala Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember Di Jember</p>		
<p>Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan ijin membuat ekstrak bagi mahasiswa kami dibawah ini :</p>		
1	Nama	: Irena Satria
2	NIM	: 151610101022
3	Semester/Tahun	: 2017/2018
4	Fakultas	: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
5	Alamat	: Jl. Danau Toba VII No.27 Jember
6	Judul Penelitian	: Efektivitas Antibakterial Ekstrak Proantosianidin Ekstrak Kulit Buah Kakao (Theobroma Cacao L.) Terhadap Streptococcus Mutans (Melalui Uji MIC Dan MBC)
7	Lokasi Penelitian	: Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember
8	Bahan yg di beli	: -
9	Waktu	: Mei 2018 s/d Selesai
10	Tujuan Penelitian	: Untuk Menganalisis Efektivitas Antibakterial Ekstrak Proantosianidin Ekstrak Kulit Buah Kakao (Theobroma Cacao L.) Terhadap Streptococcus Mutans (Melalui Uji MIC Dan MBC)
11	Dosen Pembimbing	: 1. drg. Yani Corvianidya R, M.KG 2. drg. Pujiana Endah L, M.Kes
<p>Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih</p>		
		 Dekan Pembantu Dekan I, Dr. drg. IDA Susilawati, M.Kes NIP.196109031986022001

Lampiran C. Surat Keterangan Identifikasi Tanaman

Kode Dokumen : FR-AUK-004 Revisi : 0	
 <p>KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI POLITEKNIK NEGERI JEMBER LABORATORIUM TANAMAN Jalan Mestrip Krom, Pos 104 Jember - 68101 Telp. (0331) 333532 - 333534 Fax. (0331) 333531 E-mail : Polije@polije.ac.id Web Site : http://www.Polije.ac.id</p>	
<u>SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN</u>	
No: 37/PL.17.3.1.02/LL/2018	
<p>Menindaklanjuti surat dari Wakil Dekan I Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember No: 2957/UN25.8.TL/2018 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke Laboratorium Tanaman, Jurusan Produksi Pertanian, Politeknik Negeri Jember oleh:</p>	
Nama	: 1. Ibnu Satria NIM: 151610101022 2. Yolanda Eka Putri NIM: 151610101098 3. Alifia Wandansari NIM: 151610101101
Jur/Tak/PT	: Fakultas Kedokteran Gigi/ Universitas Jember
<p>maka dapat disampaikan hasilnya bahwa spesimen tersebut di bawah ini (terlampir) adalah: <i>Kingdom: Plantae; Divisio: Spermatophyta; Sub Divisio: Magnoliophyta; Kelas: Magnoliopsida; Ordo: Malvales; Famili: Sterculiaceae; Genus: Theobroma; Spesies: Theobroma cacao, L.</i></p>	
Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.	
<p>16 Agustus 2018  M. Astuti, MP NIP. 195805201987032001</p>	

Lampiran D. Surat Identifikasi Bakteri *Streptococcus mutans*

LABORATORIUM MIKROBIOLOGI
BAGIAN BIOMEDIK KEDOKTERAN GIGI
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER

SURAT KETERANGAN

No. 0165 / MIKRO / S.KET / 2018

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

Nama : Ibnu Satria
NIM : 1516101022
Fakultas : Kedokteran Gigi Universitas Jember
Keperluan : Identifikasi Mikroorganisme

Telah melakukan uji identifikasi terhadap isolasi bakteri *Streptococcus mutans* dengan menggunakan pengecatan Gram dan diamati secara mikroskopis menunjukkan hasil *Streptococcus* gram positif.

Jember, 19 Desember 2018

Mengetahui,
Kepala Bagian Biomedik Kedokteran Gigi

Penanggung Jawab Lab. Mikrobiologi

(drg. Amandia Dewi Permasashita, M. Biomed)
NIP. 198006032006042002

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

Lampiran E. Surat Identifikasi Bakteri *Porphyromonas gingivalis*

LABORATORIUM MIKROBIOLOGI
BAGIAN BIOMEDIK KEDOKTERAN GIGI
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER

SURAT KETERANGAN
No.0164/MIKRO/S.KET/2018

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

Nama : Ibnu Satria
NIM : 151610101022
Fakultas : Kedokteran Gigi Universitas Jember
Keperluan : Identifikasi Mikroorganisme

Telah melakukan uji identifikasi terhadap isolasi bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 dengan menggunakan pengecatan Gram dan diamati secara mikroskopis menunjukkan hasil *Coccobacillus* gram negatif.

Jember, 19 Desember 2018

Mengetahui,
Kepala Bagian Biomedik Kedokteran Gigi

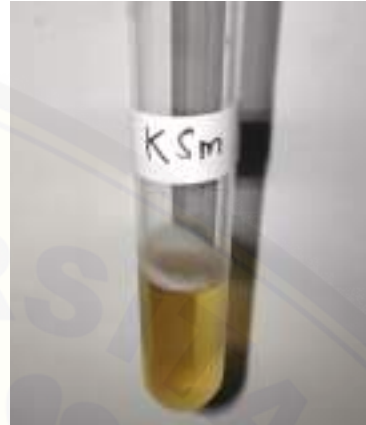
Penanggung Jawab Lab. Mikrobiologi

(drg. Amanda Dewi Permanashita, M. Biomed)
NIP. 198006032006042002

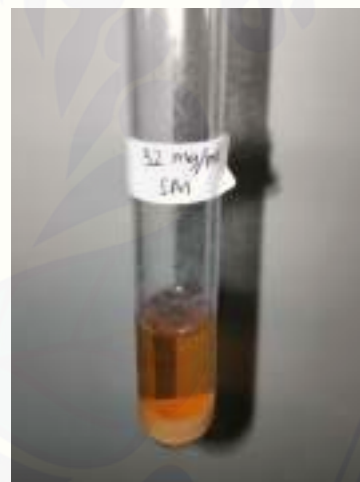
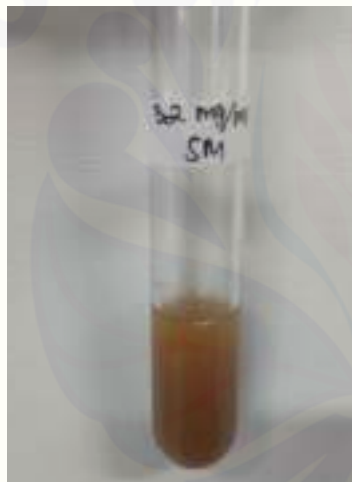
(drg. Pujiana Endah Lestari, M. kes)
NIP. 197608092005012002

Lampiran F. Hasil Penelitian**Bakteri *Streptococcus mutans***

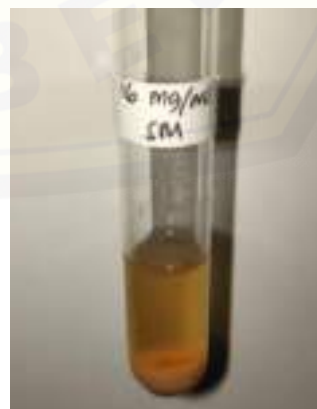
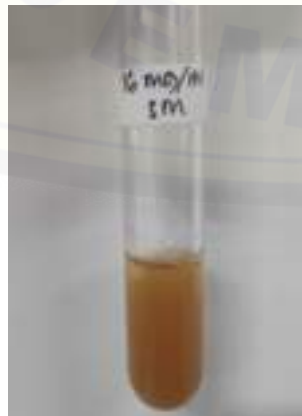
1. Kontrol Pertumbuhan (sebelum - sesudah inkubasi)



2. Konsentrasi 16 mg/ml sebagai MIC (sebelum – sesudah inkubasi)



3. Konsentrasi 8 mg/ml (sebelum – sesudah inkubasi)

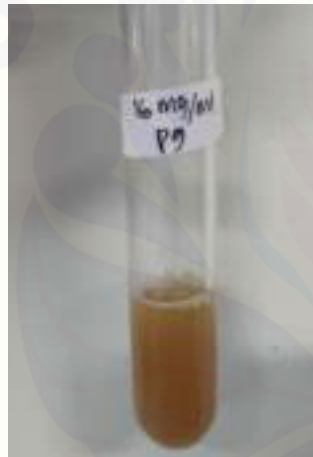


Bakteri *Porphyromonas gingivalis*

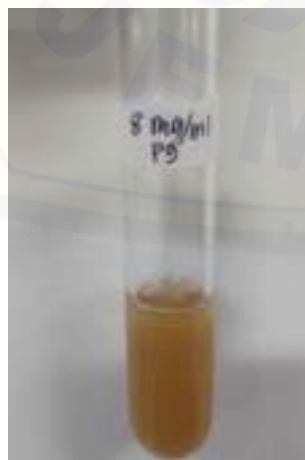
1. Kontrol Pertumbuhan (sebelum – sesudah inkubasi)



2. Konsentrasi 8 mg/ml sebagai MIC (sebelum – sesudah inkubasi)



3. Konsentrasi 4 mg/ml (sebelum – sesudah inkubasi)



Lampiran G. Data Hasil Penelitian

Uji Chi-square antara konsentrasi dan bakteri *Streptococcus mutans*

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
konsentrasi * hasil	21	100.0%	0	.0%	21	100.0%

konsentrasi * hasil Crosstabulation

Count

		Hasil		Total
		0	1	
Konsentrasi	Control	3	0	3
	1 mg/ml	3	0	3
	2 mg/ml	3	0	3
	4 mg/ml	3	0	3
	8 mg/ml	3	0	3
	16 mg/ml	0	3	3
	32 mg/ml	0	3	3
Total		15	6	21

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	21.000 ^a	6	.002
Likelihood Ratio	25.127	6	.000
Linear-by-Linear Association	12.500	1	.000
N of Valid Cases	21		

a. 14 cells (100,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,86.

Uji Chi-square antara konsentrasi dan bakteri *Porphyromonas gingivalis*

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
konsentrasi * hasil	21	100.0%	0	.0%	21	100.0%

konsentrasi * hasil Crosstabulation


Count		Hasil		Total
		0	1	
Konsentrasi	Control	3	0	3
	0,5 mg/ml	3	0	3
	1 mg/ml	3	0	3
	2 mg/ml	3	0	3
	4 mg/ml	3	0	3
	8 mg/ml	0	3	3
	16 mg/ml	0	3	3
Total		15	6	21






Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	21.000 ^a	6	.002
Likelihood Ratio	25.127	6	.000
Linear-by-Linear Association	12.500	1	.000
N of Valid Cases	21		

a. 14 cells (100,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,86.

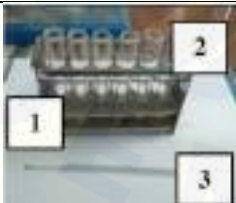

Lampiran H. Alat dan Bahan Penelitian**a. Alat dan Bahan Ekstraksi**

Gambar	Keterangan
	Timbangan
	Oven
	Cawan porselen
	Sentrifuge
	Pengaduk kaca

 A clear glass Erlenmeyer flask with a narrow neck and a wider body, used for mixing and heating liquids.	Erlenmeyer
 Two clear plastic Falcon tubes with blue caps and graduated scales, used for sample collection and storage.	Falcon tube
 A tall, cylindrical graduated glass measuring cylinder with a scale and a pouring spout at the top.	Gelas ukur
 A laboratory rotavapor system consisting of a rotating flask, a condenser, and a receiver, used for solvent removal under reduced pressure.	Rotavapor
 A rectangular laboratory shaker with a blue front panel and a stainless steel top, used for shaking samples in a water bath.	Water bath shaker
 A Buchner funnel setup for vacuum filtration, showing a funnel on a flask with a filter paper and a liquid being filtered.	Corong buchner

		<p>Kulit buah kakao (<i>Theobroma kakao</i> L.)</p>
		<p>Aseton</p>
		<p>Aquades</p>

b. Alat Kultur

Gambar	Keterangan
	<p>1. Tabung Reaksi 2. Rak Tabung Reaksi 3. Ose</p>
	<p><i>Autoclave</i></p>

		Inkubator
		Petridish tidak bersekat
		<ol style="list-style-type: none">1. Spektronik2. <i>Vibrator</i>
		Spektrofotometer

Lampiran I. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan Ekstrak



Gambar 1. (a) Mengeringkan kulit buah kakao (b) menimbang kulit buah kakao yang sudah menjadi bubuk (c) mencampurkan bubuk kulit buah kakao dengan aseton 70% dan akuades (d) dimasukkan kedalam mesin ultrasonic (e) dimasukkan kedalam valcon tube (f) disentrifuge dengan kecepatan 200 rpm selama 10 menit (g) larutan ekstrak dimasukkan kedalam rotavapor (h) larutan yang telah dirotavapor dileatakan dicawan petri (i) larutan yang ada dicawan petri dioven (j) bagian yang kental yang berada didasar cawan petri diambil dan diletakkan dalam gelas kecil.