



**UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA EKSTRAK
POLIFENOL BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L) TIDAK
TERFERMENTASI DAN TERFERMENTASI PRODUKSI
PTPN XII KALIKEMPIT - BANYUWANGI TERHADAP
*STREPTOCOCCUS MUTANS***

SKRIPSI

Oleh
Jatu Dyah Permatasari
NIM 101710101078

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2017**



**UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA EKSTRAK POLIFENOL BIJI KAKAO
(*Theobroma cacao* L) TIDAK TERFERMENTASI DAN TERFERMENTASI
PRODUKSI PTPN XII KALIKEMPIT - BANYUWANGI TERHADAP
*STREPTOCOCCUS MUTANS***

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan studi pada Program Studi Teknologi Hasil Pertanian (S-1)
dan mencapai gelar Sarjana Teknologi Pertanian

Oleh
Jatu Dyah Permatasari
NIM 101710101078

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER**

2017

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan kepada :

1. Allah SWT, puji syukur atas rahmat-Nya yang telah memudahkan segala urusan, semoga hamba mendapat rahmat dan ampunan-Mu dan berilah petunjuk supaya hamba selalu berada pada jalan-Mu;
2. Nabi Muhammad SAW, yang telah membimbing umat manusia menjadi khalifah di bumi serta menjadi teladan untuk mencapai kebahagiaan dunia dan akhirat kelak;
3. Keluargaku di Patrangdan di Kalisat, terima kasih atas segala ketulusan cinta dan kasih sayang. Dukungan, pengorbanan dan doanya selama ini.
4. Dosen Pembimbing Utama Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc dan Dosen Pembimbing Anggota Ir. Giyarto, M.Sc yang telah dengan tulus memberikan ilmu pengetahuan dan bimbingannya dengan penuh kesabaran.
5. Jajaran pimpinan PTPNXII Kebun Kalikempit, Ir. Arief Budiyanto, M.M selaku manajer, Achmad Hendy J, S. TP. Dan Juni, S. P. selaku wakil manajer, bapak Afid Tri Prasetyo, S. TP. Selaku Astekpol, dan bapak Satrio Supriyadi selaku mandor besar serta staf karyawan di PTPN XII Kebun Kalikempit, Banyuwangi atas bimbingan, bantuan dan kesabaran selama pengerjaan skripsi ini.
6. Almamater yang kebanggakan, Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.
7. Guru-guru SD, SMP, SMA, dan semua Dosen di FTP UNEJ
8. Sahabat-sahabatku semuanya yang tidak dapat saya sebutkan satu-persatu.

MOTTO

Kehidupan tidak akan pernah memberikan kesempatan untuk segala sesuatu. Jika ingin mendapatkan kesempatan untuk melakukan sesuatu, Anda harus menciptakan sendiri kesempatan itu.

(Charles Buxton)

Keberhasilan tidak pernah mendatangimu tapi kamu sendiri yang harus mendatangnya (Marva Collins)

Rahasia kesuksesan adalah selalu bersyukur atas segala yang kita miliki, sekecil apapun itu dan tidak membenci hidup atas hasil yang belum pernah diberikanNya kepada kita

(Walters, J.D)

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Jatu Dyah Permatasari

NIM : 101710101078

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “**UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA EKSTRAK POLIFENOL BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L) TIDAK TERFERMENTASI DAN TERFERMENTASI PRODUKSI PTPN XII KALIKEMPIT - BANYUWANGI TERHADAP *STREPTOCOCCUS MUTANS***” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 04 Agustus 2017

Yang menyatakan,

Jatu Dyah permatasari

NIM 101710101078

SKRIPSI

**UJI AKTIVITAS ANTIMUIKROBA EKSTRAK POLIFENOL BIJI
KAKAO (*Theobroma cacao* L) TIDAK TERFERMENTASI DAN
TERFERMENTASI PRODUKSI PTPN XII KALIKEMPIT -
BANYUWANGI TERHADAP *STREPTOCOCCUS MUTANS***

Oleh :

Jatu Dyah Permatasari

NIM 101710101078

Pembimbing :

Dosen Pembimbing Utama : Dr. Ir. Sony Suwasono, M. App. Sc.

Dosen Pembimbing Anggota : Ir. Giyarto, M.Sc.

PENGESAHAN

Skripsiberjudul “**Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Polifenol Biji Kakao (*Theobroma Cacao L*) Tidak Terfermentasi Dan Terfermentasi Produksi PTPN XII Kalikempit – Banyuwangi Terhadap *Streptococcus Mutans***” karya Jatu Dyah Permatasari 101710101078 telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember pada :

Hari/tanggal : Jum’at, 04 Agustus 2017

Tempat : Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama

Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc
NIP. 196411091989021002

Dosen Pembimbing Anggota,

Ir. Giyarto, M.Sc.
NIP.196607181993031013

Tim
Penguji:

Ketua

Anggota

Ir. Mukhammad Fauzi, M.Si.
NIP. 196307011989031004

Miftahul Choiron S.Tp, M.Sc
NIP. 198503232008011002

Mengesahkan
Dekan Fakultas Teknologi Pertanian

Dr. Siswoyo Soekarno, S.TP., M.Eng
NIP. 196809231994031009

RINGKASAN

Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Polifenol Biji Kakao Tidak Terfermentasi dan Terfermentasi Produksi PTPN XII Kalikempit-Banyuwangi Terhadap *Streptococcus mutans*. Jatu Dyah Permatasari, 101710101078. 2017. 38 Halaman. Jurusan Teknologi hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Indonesia merupakan negara penghasil kakao terbesar ketiga didunia setelah Ghana dan Pantai Gading. Biji kakao mengandung protein, karbohidrat, lemak, dan polifenol. Polifenol yang terkandung pada biji kakao sangat tergantung pada kualitas biji kakao dan proses pengolahan. Beberapa kandungan polifenol yang bermanfaat di bidang kesehatan ialah flavonoid dan EGCG. Polifenol memiliki senyawa Epigalokatengingatlat (EGCG) yang selain berfungsi sebagai antioksidan juga diduga dapat bermanfaat dalam penghambatan aktivitas biologis bakteri *Streptococcus mutans* penyebab karies gigi. Salah satu faktor yang sangat menentukan adalah fermentasi kakao. Perkebunan PTPN XII Kalikempit-Banyuwangi merupakan salah satu perkebunan besar milik Negara yang memproduksi biji kakao paling banyak diantara perkebunan-perkebunan besar yang ada di Banyuwangi. Kandungan polifenol yang berbeda pada biji kakao terfermentasi dan tidak terfermentasi diduga juga memiliki konsentrasi hambatan minimum (KHM) yang berbeda pula.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kandungan total polifenol antara biji kakao terfermentasi dan tidak terfermentasi. Setelah itu dilakukan uji penghambatan terhadap bakteri *S. Mutan* dengan penentuan konsentrasi hambatan minimum dan inhibition concentration 50% atau IC50 sehingga dapat diketahui potensi polifenol sebagai antimikroba.

Proses penelitian ini dilakukan dengan dua tahap. Tahap pertama yaitu ekstraksi bubuk polifenol kasar biji kakao terfermentasi dan tidak terfermentasi. Tahap kedua yaitu dilakukan uji total polifenol dan uji penghambatan terhadap *S. Mutans*.

Secara umum total polifenol biji kakao terfermentasi (H4) yaitu 177,63 mg/g dan total polifenol biji kakao tidak terfermentasi (H0) yaitu 284,56 mg/g. Berdasarkan hasil tersebut dapat diketahui bahwa sampel H4 memiliki total polifenol yang rendah dibanding sampel H0. Penentuan nilai KHM dan IC50 terhadap *S. Mutan* menggunakan dua metode perhitungan yaitu kurva reguler dan kurva logaritmik. Berdasarkan kurva reguler, nilai KHM untuk H0 yaitu 8,1 mg/ml dan nilai IC50 yaitu 0,746 mg/ml sedangkan untuk H4 nilai KHM 9,64 mg/ml dan IC50 0,605 mg/ml. Secara logaritmik nilai KHM dan IC50 untuk H0 yaitu 0,85772 mg/ml dan 0,25263 mg/ml sedangkan untuk H4 0,86573 mg/ml dan 0,26061 mg/ml. Berdasarkan kedua perhitungan dapat diketahui bahwa H0 memiliki kandungan polifenol lebih tinggi dibandingkan H4.

SUMMARY

Antimicrobial activity cocoa polyphenol extract non fermented and fermented PTPN XII Kalikempit-Banyuwangi production toward Streptococcus mutans
Jatu Dyah Permatasari, 101710101078;2017; 38 pages; Department of Agricultural Product Technology Faculty of Agricultural Technology, University of Jember.

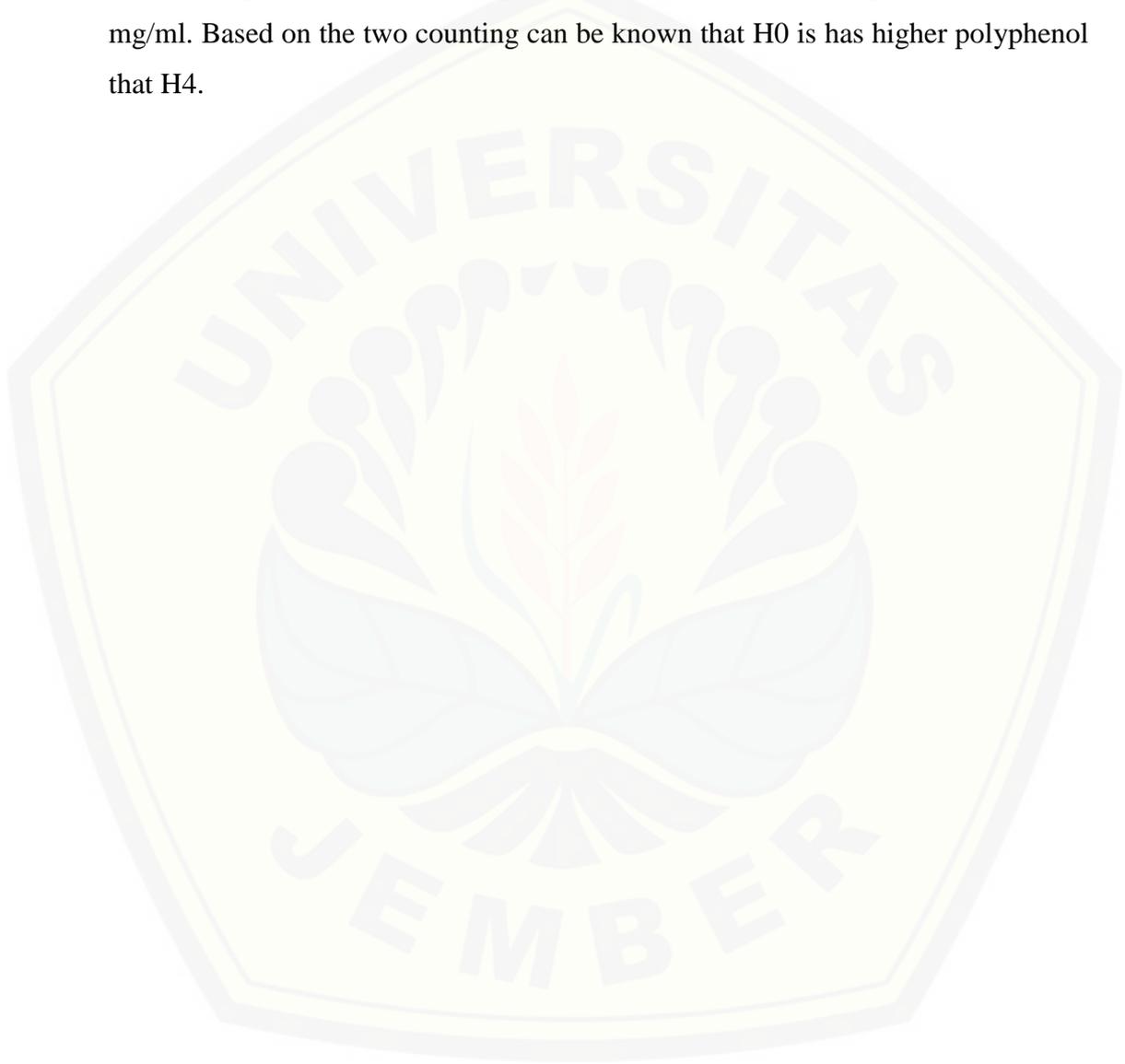
Indonesia is the top three cocoa producer in the world after Ghana and Pantai Gading. Cocoa contains protein, carbo,fat, and natural color. Certain polifenol that is in the cocoa is depend on quality of the cocoa and the process of production. Some of udefull polyphenol in cocoa is flavonoid and EGCG. Polyphenols have compounds Epigalokatengingalat (EGCG) whivh have function as antioxidans and its benefit as biology activity resistance in Streptococcus mutans which role as carier. One of the factor is cacao fermentation. PTPN XII Kalikempit-Banyuwangi plation is one of the best plantation as the state property. Its product the largest cocoa between many best plantation in Banyuwangi. Mouth and theeth problem that were happend in the public is caries teeth that caused by *Streptococcus mutan*. The different polyphenol in the fermented and unfermented. Cocoa is suspected contains the difference minimum inhibition concentration (MIC)too.

This analysis is aimed to know the total polyphenol extract between fermented and unfermented cocoa. After that, the MIC test is done to count the concentration resistance and inhibition concentration 50% or IC50 the polyphenol potention as antimicroba can be know.

This research is conducted by two steps. The first is the extraction of the rough polyphenol powder that is in the fermented and unfermented cocoa. The last step is doing the total polyphenol test and the resistance of growing *mutant* test.

In sum, the total polyphenol in fermented cacao (H4) is 177,63 mg/g and in unfermented cocoa (H0) is 284,56 mg/g. Based on that result is know that the sample of H4 has low polyphenol compared with H0 sample. The value of MIC

and IC50 in *S. Mutans* is use two method of counting, they are regular curve and alogaritmatic. Based on regular curve, the MIC value for H0 is 8,1 mg/g and for IC50 is 0,746 mg/ml. Indeed for H4, the value of MIC value is 9,64 mg/ml and IC50 is 0,605 mg/ml. Logarimatically the value of MIC and IC50 for H0 is 0,85772 mg/ml and 0,25263 mg/ml, while H4 is 0,86573 mg/ml and 0,26061 mg/ml. Based on the two counting can be known that H0 is has higher polyphenol that H4.



PRAKATA

Puji dan syukur ke hadirat kepada Allah Swt. atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Polifenol Biji Kakao (*Theobroma Cacao* L) Tidak Terfermentasi Dan Terfermentasi Produksi PTPN XII Kalikempit – Banyuwangi Terhadap *Streptococcus Mutans*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan Strata Satu (S1) pada Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

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

1. Dr. Siswoyo Soekarno, S.TP, M. Eng., selaku Dekan Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember;
2. Direksi PTPN 12 melalui Kantor Wilayah II PTPN 12 di Jember dan Kebun PTPN 12 Kalikempit di Banyuwangi yang telah membantu dalam penyediaan buah kakao untuk penelitian.
3. Ir. Giyarto, M.S., selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Universitas Jember, sekaligus sebagai Dosen Pembimbing Anggota, yang telah meluangkan waktu dan pikiran guna memberikan bimbingan dan pengarahan demi kemajuan penyelesaian penelitian dan penulisan skripsi ini;
4. Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc., selaku Dosen Pembimbing Utama sekaligus pemilik proyek penelitian yang telah meluangkan waktu dan pikiran guna memberikan bimbingan dan pengarahan demi kemajuan penyelesaian penelitian dan penulisan skripsi ini;
5. Tim penguji skripsi Ir. Mukhammad Fauzi, M.Si., dan Miftahul Choiron S.Tp, M.Sc atas saran dan evaluasi demi perbaikan penulisan skripsi;
6. Teknisi laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Hasil Pertanian, Laboratorium Biokimia Pangan dan Hasil Pertanian dan Laboratorium Rekayasa Pangan dan Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian, Jurusan Teknologi Hasil

Pertanian, Universitas Jember yang telah mendukung sehingga penelitian dapat berjalan dengan lancar;

7. Ayahanda Karnoto dan Ibunda Paryati (alm), kakakku tercinta Ita dan Antok, suamiku Faruq Hidayat S. Pd dan anakku Nadifa dan Alfian beserta seluruh keluarga besar yang telah memberikan do'a dan dorongan demi terselesaikannya skripsi ini;
8. Sahabat-sahabat THP 2010 yang telah memberikan dukungan dan semangat;
9. Tim peneliti kakao (Sayi, Arsyta, dan Erna) terima kasih atas kebersamaan kalian selama penelitian;
10. UKM-KI KOSINUS TETA yang telah memberikan pengalaman yang sangat bermanfaat;
11. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu, terima kasih atas segala bantuan dan kerja samanya.

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

Jember, 04 Agustus 2017

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
HALAMAN RINGKASAN	vii
SUMMARY	ix
PRAKATA	xi
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Buah Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L).....	5
2.2 Polifenol Kakao.....	8
2.3 Teknologi Pengolahan Biji kakao.....	11
2.3.1 Pemanenan	11
2.3.2 Pemecahan Buah.....	11
2.3.3 Transportasi	11
2.3.4 Fermentasi	11
2.3.5 Pencucian	12
2.3.6 Pengeringan	12

2.3.7 Sortasi Kering	12
2.3.8 Pengepakan dan Penyimpanan	13
2.4 Fermentasi Kakao	13
2.5 Ekstraksi Polifenol	14
2.6 Pembebasan Lemak Kakao	14
2.7 <i>Streptococcus mutans</i>	16
2.8 Mekanisme Penghambatan Polifenol Terhadap <i>S. mutans</i>	17
BAB 3. METODE PENELITIAN	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	19
3.2 Bahan dan Alat Penelitian.....	19
3.2.1 Bahan Penelitian	19
3.2.2 Alat Penelitian.....	19
3.3 Metode Penelitian.....	19
3.3.1 Rancangan Penelitian	19
3.3.2 Pelaksanaan Penelitian.....	20
3.3.3 Variabel Pengamatan.....	23
3.3.4 Prosedur Analisis.....	24
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Total Polifenol (Metode Follin-Ciacaltue)	27
4.2 Penentuan Konsentrasi Hambatan Minimum (KHM) dan Konsentrasi Hambatan 50 (IC₅₀) pada <i>Streptococcus mutans</i> ...	28
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan	32
5.2 Saran	32
DAFTAR PUSTAKA	33

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Komposisi kimia biji kakao sebelum fermentasi.....	6

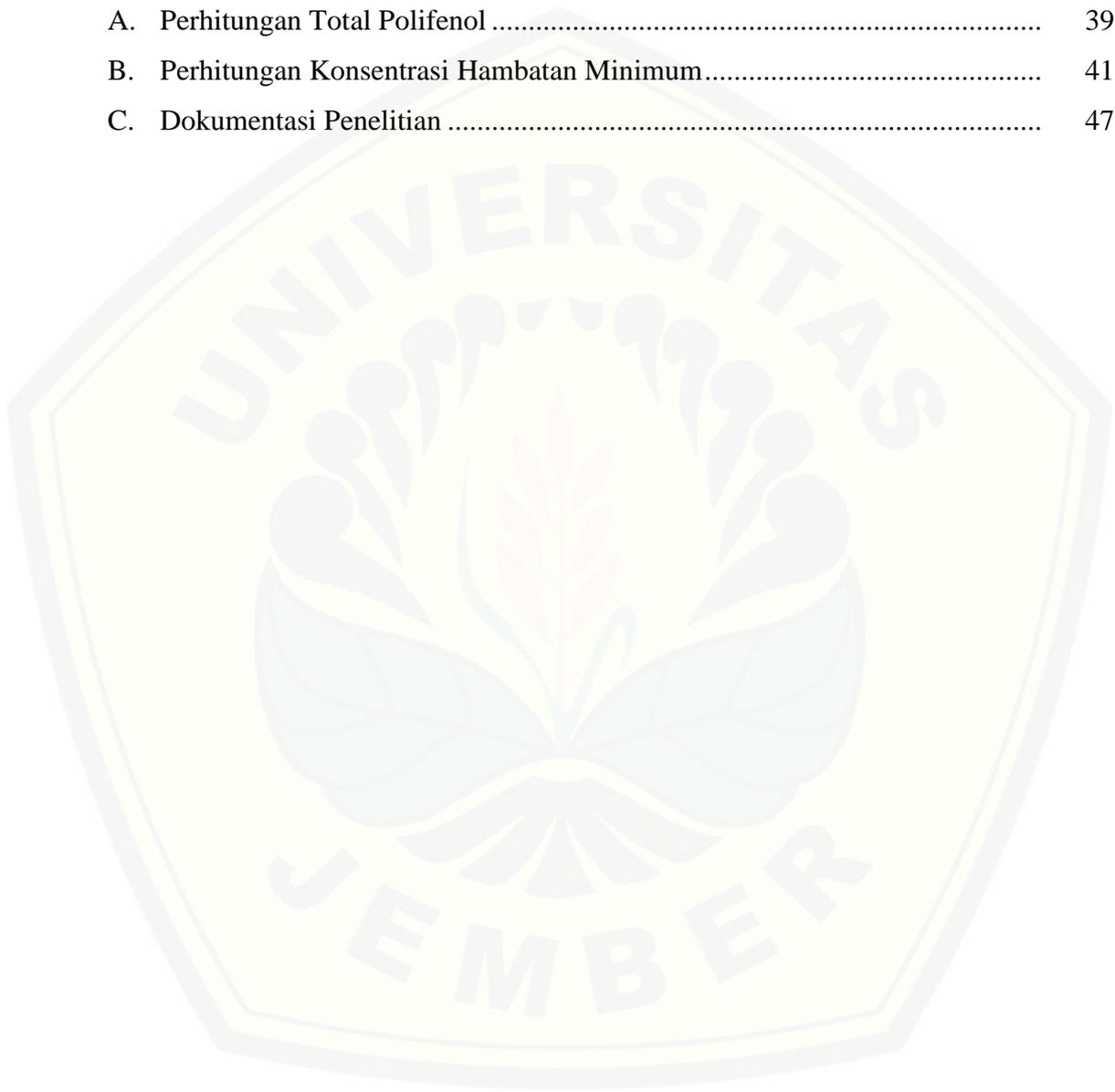


DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Buah Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L)	6
2.2 Struktur Polifenol Biji Kakao	9
3.1 Proses Pembuatan Bubuk Kakako Kering Rendah Lemak 2	21
3.2 Proses Pembuatan Bubuk Polifenol Kasar	23
4.1 Kurva Total Polifenol	27
4.2 Kurva Regular Penghambatan <i>Streptococcus mutans</i>	29
4.3 Kurva Logaritmik Penghambatan <i>Streptococcus mutans</i>	30

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Perhitungan Total Polifenol	39
B. Perhitungan Konsentrasi Hambatan Minimum.....	41
C. Dokumentasi Penelitian	47



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kakao adalah salah satu komoditas unggulan perkebunan di Indonesia. Terbukti Indonesia merupakan Negara penghasil kakao terbesar ketiga setelah Ghana dan Pantai Gading (Dirjen Pengolahan dan Pemasaran Hasil Pertanian, 2013). Selama periode April 2013, surplus neraca perdagangan kakao Indonesia adalah terbesar kelima yakni sebesar US\$ 56,38 juta setelah minyak sawit (US\$ 1,30 milyar), karet sebesar (US\$ 634,26 juta), kopi (US\$ 84,05 juta), dan kelapa (US\$ 59,15 juta). Jumlah realisasi ekspor pada periode yang sama, kakao menempati urutan keempat yakni sebesar US\$ 77,42 juta, setelah minyak sawit US\$ 1,31 milyar, karet sebesar US\$ 638,1 juta, dan kopi sebesar US\$ 92,32 juta (BPS diolah Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian Kementerian Pertanian, 2013).

Produksi dan ekspor biji kakao di Indonesia cukup besar yaitu berkisar 740.513 ton pada tahun 2012 dengan luas area tanaman mencapai 1.774.463 ha. Jumlah biji kakao yang diekspor sekitar 80-90% dalam bentuk biji kakao kering dan 10-20% berupa produk olahan. Salah satu daerah penghasil biji kakao yang cukup besar di Indonesia yaitu Jawa Timur yang mampu menyumbang produksi sebesar 28.575 ton (Dirjen Perkebunan, 2013).

Pengolahan kakao secara baku meliputi: pemanenan, pemecahan buah, transportasi, fermentasi, pencucian, penjemuran, pengeringan mekanis, sortasi, pengepakan dan penyimpanan biji kakao kering (Widyotomo, 2006). Proses fermentasi pada pengolahan biji kakao dapat mempengaruhi mutu kakao yang dihasilkan. Fermentasi berfungsi agar diperoleh biji kakao kering yang bermutu baik dan memiliki calon aroma serta citarasa khas coklat. Selain itu selama proses ini terjadi penurunan kadar polifenol yang dapat menurunkan rasa kelat.

Biji kakao mengandung protein, karbohidrat, lemak, dan polifenol. Kandungan lemak yang tinggi dalam biji kakao dapat dimanfaatkan sebagai kakao

butter dan polifenol yang terkandung diketahui memiliki aktivitas antimikroba yang sangat baik dan bermanfaat bagi kesehatan tubuh dan dapat digunakan sebagai pewarna alami.

Selain itu, penelitian secara *in vitro* dan *in vivo* menunjukkan bahwa polifenol biji kakao memiliki antioksidan yang mampu menekan hidrogen peroksida, melindungi lemak dari kerusakan oksidasi, bersifat anti mikrobial untuk membunuh mikroorganisme yang tidak diinginkan dalam pangan atau untuk mencegah dan menghambat pertumbuhannya, menghambat pertumbuhan tumor dan kanker, serta dapat mengurangi penyakit-penyakit karena oksidasi *low density lipoprotein* (LDL) (Misnawi *et. Al.*, 2003).

Potensi biji kakao sebagai sumber antioksidan dan pewarna alami cukup besar, mengingat kandungan polifenolnya cukup tinggi. Biji kakao mengandung senyawa polifenol sebanyak 5-18% dalam bubuk bebas lemak. Polifenol biji kakao terdiri dari 3 kelompok yaitu katekin 37%, antosianin 4% dan protosianidin 58% (Wollgast dan Anklam, 2000). Polifenol biji kakao memiliki aktifitas antioksidan yang sangat bermanfaat bagi kesehatan tubuh dan dapat digunakan sebagai pewarna alami (Misnawi *et. al.*, 2003). Polifenol juga memperkuat mekanisme pertahanan terhadap suatu organisme sehingga memiliki sifat anti-mikroba, anti-kanker, dan antioksidan.

Jumlah polifenol yang dihasilkan buah kakao sangat tergantung pada kualitas biji kakao dan proses pengolahan. Salah satu faktor yang sangat menentukan adalah fermentasi biji kakao. Misnawi (2005) menyatakan bahwa rentang kandungan polifenol dalam biji kakao non fermentasi yaitu 120-180 g/kg, sedangkan dalam biji terfermentasi berkurang menjadi <50 g/kg. Polifenol dalam buah kakao masak lebih tinggi dibandingkan buah yang masih muda karena pembentukan polifenol yang belum sempurna pada buah kakao muda. Salah satu upaya untuk meningkatkan potensi agrobisnis kakao Indonesia adalah dengan memanfaatkan kandungan yang terdapat dalam senyawa kakao tersebut yaitu senyawa polifenol.

Polifenol memiliki banyak kandungan bahan aktif di dalamnya yang dapat dimanfaatkan di bidang kesehatan. Beberapa kandungan polifenol biji kakao yang bermanfaat di bidang kesehatan ialah flavonoid dan EGCG. Polifenol memiliki senyawa *Epigalokatengingalat* (EGCG) yang selain berfungsi sebagai antioksidan juga diduga dapat bermanfaat dalam penghambatan aktivitas biologis bakteri *Streptococcus mutans* yang berperan penting sebagai penyebab karies (Misnawi *et. al.*, 2008).

Perkebunan PTPN XII Kalikempit-Banyuwangi merupakan salah satu perkebunan besar Negara (badan usaha milik Negara) yang terletak di Desa Tulungrejo, Kecamatan Glenmore, Kabupaten Banyuwangi. Perkebunan ini memproduksi biji kakao paling banyak diantara perkebunan-perkebunan besar yang ada di Banyuwangi dengan luasa area mencapai 432,28 ha untuk kakao forastero/bulk dan menghasilkan 255,149 ton pada tahun 2013. Besarnya produksi biji kakao tersebut menjadikan biji kakao yang dihasilkan beragam yaitu 80% biji berkualitas baik, 16% berkualitas sedang dan 4% berupa biji cacat (sumber PTPN XII Kalikempit-Banyuwangi). Kandungan polifenol yang berbeda pada biji kakao terfermentasi dan tidak terfermentasi diduga juga memiliki konsentrasi hambatan minimum (KHM) yang berbeda pula. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui besarnya konsentrasi minimum hambatan antara biji kakao tidak terfermentasi dan terfermentasi yang didapat dari PTPN XII Kebun Kalikempit-Banyuwangi terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans*.

1.2 Perumusan Masalah

Jumlah polifenol yang dihasilkan buah kakao sangat tergantung pada kualitas biji kakao dan proses pengolahan. Salah satu faktor yang sangat menentukan adalah fermentasi biji kakao. Pemanfaatan senyawa polifenol juga dapat diterapkan pada biji kakao superior sebagai salah satu teknologi hilir. Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan penelitian terhadap kandungan total polifenol biji fermentasi dan tidak terfermentasi. Penelitian yang dilakukan Reyhan (2014) didesa Sawur, kecamatan Pojong, kabupaten Gunung Kidul, Yogyakarta menunjukkan total polifenol tertinggi terdapat pada sampel non

fermentasi yaitu 19,52% dan terendah pada sampel fermentasi 9,98%. Penelitian yang dilakukan Ernawati (2015) untuk pengujian KHM ekstrak polifenol tidak terfermentasi dan terfermentasi terhadap *Esherichia coli* menunjukkan 0,157% dan 1,801% sedangkan *Bacillus subtilis* 0,14% dan 0,31%. Jumlah kandungan polifenol yang berbeda antara biji kakao terfermentasi dan tidak terfermentasi akan mempengaruhi aktivitas antimikroba dari ekstrak polifenol tersebut terhadap pertumbuhan mikroba. Oleh karena itu, perlu diketahui besarnya konsentrasi minimum antara ekstrak polifenol dari biji terfermentasi dan tidak terfermentasi dalam menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans* yang terdapat pada rongga mulut, sehingga perlu dilakukan penelitian ini.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui total polifenol dan besarnya konsentrasi minimum ekstrak polifenol dari biji kakao terfermentasi dan tidak terfermentasi dalam menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans*.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini, antara lain :

- a. memberikan informasi tentang konsentrasi hambatan minimum biji kakaoterfermentasi dan tidak terfermentasi dalam menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans*,
- b. mendapatkan senyawa polifenol dari biji kakao terfermentasi dan tidak terfermentasi yang memiliki aktivitas antimikroba, dan
- c. dengan mengetahui keefektifan polifenol biji kakao dalam menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans*, diharapkan polifenol kakao dapat dimasukkan ke dalam bahan makanan maupun pasta gigi untuk pencegahan karies gigi.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Kakao (*Theobroma cacao L*)

Tanaman kakao berasal dari lembah Amazon, Amerika Serikat dan daerah utama penanaman kakao adalah hutan hujan tropis di Amerika Tengah. Tanaman kakao menumbuhkan bunganya dari batang atau cabang (Siregar *et. al.*, 2003).

Taksonomi kakao adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae

Subkingdom: Tracheobionta

Super Divisi: Spermatophyta

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Sub Kelas : Dilleniidae

Ordo : Malvales

Famili : Sterculiaceae

Genus : *Theobroma*

Spesies : *Theobroma cacao L.*

Tiga komponen utama penyusun buah kakao yaitu kulit buah, plasenta, dan biji. Komponen paling dominan yaitu kulit buah dengan presentase lebih dari 70% berat buah masak. Biji kakao memiliki presentase berkisar 27-29% berat buah masak, sedangkan sisanya merupakan pengikat dari 30-40 biji (plasenta). Biji diselubungi lapisan lendir atau pulpa berwarna putih (Widyotomo *et. al.*, 2004). Di dalam buah, biji tersusun dalam 5 baris mengelilingi poros buah, jumlahnya beragam antara 20-50 biji per buah. Pada buah muda, biji menempel pada kulit bagian dalam, tetapi bila buah masak, maka biji akan lepas dari kulit buah dan akan berbunyi bila digoncang. Permukaan biji kakao diselubungi pulp yang berwarna putih. Pulp merupakan jaringan halus berlendir dan melekat ketat pada biji kakao. Biji kakao yang berasal dari buah yang matang mempunyai pulp yang lunak dan manis. Kulit pada buah kakao masak berwarna kuning atau oranye

yang saat masih muda berwarna hijau atau merah. Buah masak memiliki kondisi optimal dalam hal pembentukan senyawa penyusun lemak dalam biji. Buah muda memiliki rendemen lemak rendah, persentase biji pipih (*flat beans*) tinggi, kadar kulit biji tinggi, dan biji kakao yang dihasilkan tidak memiliki cita rasa khas yang maksimal (Widyotomo *et al.*, 2004). Buah *Theobroma cacao* L dapat dilihat pada **Gambar 2.1**



Gambar 2.1 *Theobroma cacao* L. (Jatu, 2014)

Kakao dapat dibedakan menjadi tiga jenis sebagai berikut :

a. Criollo (*Theobroma cacao* L sp *Cocoa Cuat*)

Criollo merupakan tanaman kakao yang memiliki mutu tinggi, hampir seluruh biji berwarna putih dan fermentasinya begitu cepat. Jenis ini terdiri dari Criollo Amerika Tengah dan Amerika Selatan. Jenis ini menghasilkan biji coklat yang mutunya sangat baik dan dikenal sebagai “coklat mulia, *fine flavour cocoa, choiced cocoa, edel cocoa*”. Kakao jenis Criollo ini mempunyai ciri-ciri diantaranya warna buah hijau, kulit buahnya tipis berbintil kasar dan lunak, biji buahnya berbentuk bulat telur dan berukuran besar dengan kotiledon berwarna putih pada waktu basah. Tunas-tunas mudanya berbulu dan daunnya relatif kecil. Kulit buah tipis dan mudah diiris serta dapat ditanam di tempat yang memiliki ketinggian 120 meter dari permukaan air laut. Kelemahan jenis kakao Criollo ini pertumbuhannya rentan terhadap penyakit kanker batang penyebab *Phytophthora* sp.

b. Forastero

Forastero adalah jenis kakao dengan jumlah populasi yang terbesar meliputi tanaman yang dibudidayakan, tanaman setengah liar maupun tanaman liar. Beberapa jenis kakao yang termasuk dalam golongan forastero adalah populasi amelonado dan populasi amazon. Jenis kakao Forastero ini banyak diusahakan di berbagai negara produsen kakao dan menghasilkan biji kakao yang mutunya sedang atau *bulk cocoa*, atau dikenal juga sebagai *ordinary cocoa*. Adapun ciri dari kakao jenis Forastero ini adalah buahnya berwarna hijau, kulitnya tebal, biji buahnya tipis/gepeng dan kotiledon berwarna ungu pada waktu basah (Sunanto, 1992).

c. Trinitario

Jenis kakao ini merupakan campuran atau hybrida dari jenis Criollo dan jenis Forastero secara alami, sehingga kakao jenis ini sangat heterogen. Kakao Trinitario menghasilkan biji yang termasuk *Fine Flavour Cocoa* dan ada yang termasuk *Bulk Cocoa*. Kakao jenis Trinitario ini memiliki ciri diantaranya buahnya berwarna hijau atau merah dan bentuknya bermacam-macam, biji buahnya juga bermacam-macam dengan kotiledon berwarna ungu muda sampai ungu tua, pada waktu basah (Sunanto, 1992).

Biji kakao terdiri dari dua bagian utama yaitu kulit biji dan keping biji atau kotiledon yang didalamnya mengandung protein, karbohidrat, lemak, dan polifenol (Misnawi, 2005). Komposisi kimia biji kakao sebelum difermentasi dapat dilihat pada **Tabel 2.1**.

Tabel 2.1 Komposisi kimia biji kakao sebelum fermentasi

Komponen kimia biji kakao	Berat kandungan (%)	
	Kotiledon	Kulit Biji
Air	2,1	3,8
Lemak	54,1	3,43
Abu	2,7	8,1
Total N	2,2	2,6
Protein	1,3	2,1
Theobromin	1,4	1,3
Kafein	0,7	0,1
Glukosa	0,1	0,1
Sukrosa	0	8,1
Pati	6,1	0
Pektin	4,1	8,0
Serat Kasar	2,1	18,6
Selulosa	1,9	13,6
Pentosan	1,2	7,0
Mucilage dan gums	1,8	9,1
Cocoa Purple/Cocoa Brown	4,2	2,0
Asam Asetat	0,1	0,1
Asam Sitrat	0	0,7
Asam Oksalat	0,3	0,3

Sumber : Ridwan, 2007

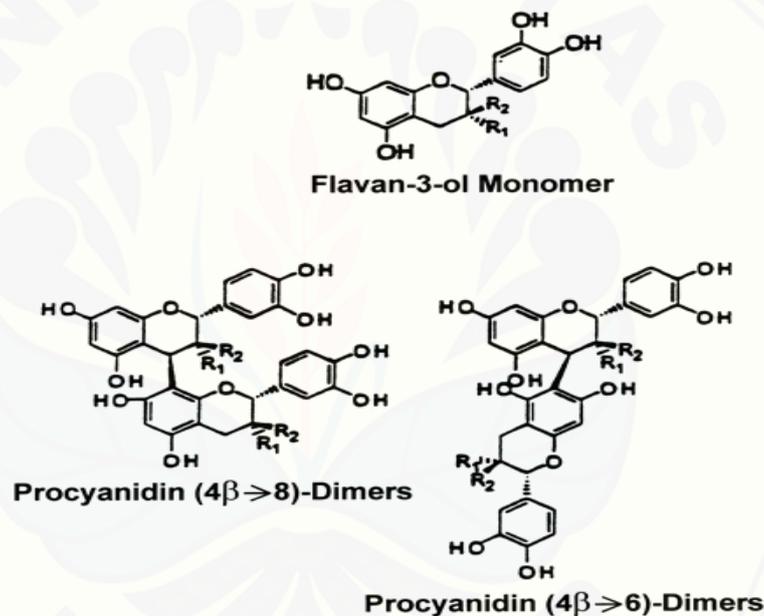
2.2 Polifenol Biji Kakao

Polifenol adalah suatu senyawa yang tersusun dari banyak senyawa fenol. Fenol merupakan senyawa non gizi yang mempunyai minimal satu cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksil. Senyawa polifenol dari tanaman dapat berbentuk antara lain asam fenolat, flavonoid dan tanin.

Keberadaan polifenol tidak hanya bertanggung jawab terhadap pembentukan rasa pahit dan sepat, tetapi juga menyebabkan karakteristik warna coklat dari biji kakao terfermentasi. Selama fermentasi, polifenol akan mengalami modifikasi biokimia melalui oksidasi dan polimerisasi serta berikatan dengan protein sehingga mengurangi kelarutan dan efek sepatnya. Pada saat yang sama, senyawa antosianin terhidrolisis dan menghasilkan antosianidin, galaktosa dan arabinosa. Di samping itu, selama fermentasi terjadi dimerisasi dari leukosianidin dan eksudasi flavonoid dari biji kakao. Selanjutnya selama pengeringan jumlah polifenol berkurang terutama akibat pencoklatan enzimatis (Misnawi *et. al.*, 2003).

Biji kakao merupakan sumber yang kaya zat bioaktif antioksidan dalam bentuk polifenol khususnya flavonoid yang bermanfaat bagi kesehatan dan mengandung banyak monomer epikatekin (flavan-3-ol) juga molekul prosianidin (bentuk polimer). Fungsi antioksidan kakao melalui mekanisme penangkapan radikal bebas dan penghambatan oksidasi oleh enzim-enzim lipoxigenase. (Trilaksani, 2003).

Polifenol kakao diklasifikasikan dalam tiga kelompok yaitu katekin (flavan-3-ol) 37%, antosianin 4% dan prosianidin 58%, 1% dari komponen polifenol tersebut adalah flavono glikosida. **Gambar 2.2** menunjukkan susunan dasar monomer flavan-3-ol dan prosianidin.



Gambar 2.2 Struktur polifenol biji kakao (Wahyudin, 2012)

Proantosianidin merupakan suatu oligomer atau polimer dengan berat molekul tinggi yang terdiri dari monomer flavan-3-ol ((+)-katekin dan (-)-epikatekin) yang juga dikenal sebagai tanin terkondensasi. Senyawa yang tergolong tanin ialah senyawa polifenol yang mengandung gugus hidroksil dan gugus lainnya (seperti karboksil), sehingga mampu membentuk kompleks kuat dengan protein. Tanin dibagi menjadi tanin terkondensasi dan tanin terhidrolisis. Tanin terkondensasi dihasilkan melalui polimerisasi flavan-3-ol (katekin) atau

flavan-3,4-diol atau kombinasi keduanya, sedangkan tanin terhidrolisis terdiri dari beberapa grup asam galat dan bergabung karena adanya penghubung ester menuju residu glukosa sentral (William dalam Arunachalam, 2003). Proantosianidin memiliki aktivitas farmakologi sebagai antioksidan, antitumor, antivirus, antibakteri, kardioprotektif, antiinflamasi, dan efek imunodulator (Nam-Young *et. al.*, 2010). Oksidasi proantosianidin dapat membentuk polimer yang dapat mengakibatkan toksisitas pada bakteri (Karou *et. al.*, 2005).

Katekin atau biasa disebut flavanol atau flavan-3-ol merupakan isomer dengan konfigurasi trans, sedangkan epikatekin merupakan isomer dengan konfigurasi cis. Masing-masing konfigurasi tersebut memiliki dua stereoisomer yaitu (+)-katekin, (-)-katekin, (+)-epikatekin, dan (-)-epikatekin. Dua isomer yang sering ditemukan di tanaman yaitu (+)-katekin dan (-)-epikatekin (Tsao, 2010). Katekin memiliki aktivitas sebagai antibakteri yang dapat menghambat penempelan bakteri pada permukaan sel inang dengan cara berinteraksi dengan makromolekul pada bakteri misalnya karbohidrat dan protein (Janecki *et. al.*, 2010).

Menurut Susanto (1995), Biji kakao mengandung polifenol yang terdiri dari antosianin dan leukoantosianin 3%, katekin 3% dan polifenol kompleks. Diantara senyawa polifenol dan flavonoid dari kakao, tannin, kelompok flavan 3-ol dan antosianin adalah senyawa penentu rasa sepat serta mempengaruhi kestabilan dan daya cerna kakao.

Keberadaan polifenol tidak hanya bertanggung jawab terhadap pembentukan rasa pahit dan sepat, tetapi juga menyebabkan karakteristik warna coklat dari biji kakao terfermentasi (William, 1971 dalam Misnawi *et. al.*, 2003). Selama fermentasi berlangsung, polifenol akan mengalami modifikasi biokimia melalui oksidasi dan polimerisasi serta berikatan dengan protein, sehingga mengurangi kelarutan dan efek sepatnya (Bovenhi and coll, 2000 dalam Misnawi *et. al.*, 2003). Di saat yang sama, antosianin terhidrolisis menghasilkan entosianidin, galaktosa dan arabinosa. Disamping itu juga terjadi dimerisasi dari leukosianidin dan eksudasi flavanoid dari biji kakao. Selanjutnya selama

pengeringan jumlah poolifenol berkurang akibat pencoklatan enzimatis (Misnawi dkk., 2003).

2.3 Teknologi Pengolahan Biji Kakao

Menurut Widyotomo *et al* (2006), pengolahan kakao secara baku meliputi: pemanenan, pemecahan buah, transportasi, fermentasi, pencucian, penjemuran, pengeringan mekanis, sortasi, pengepakan dan penyimpanan biji kakao kering.

2.3.1 Pemanenan

Buah kakao dipanen atau dipetik tepat matang. Kriteria buah masak adalah alur buah berwarna kekuningan untuk buah yang warna kulitnya merah pada saat masih muda, atau berwarna kuning tua atau jingga untuk buah yang warna kulitnya hijau kekuningan pada saat masih muda. Untuk menentukan kematangan buah kakao dapat juga dilakukan dengan mengetuk buah kakao menggunakan jari telunjuk. Hal ini biasa dilakukan oleh pemetik buah yang sudah berpengalaman (Zulkifli M. dan Soenaryo, 1978).

2.3.2 Pemecahan Buah

Pemecahan buah dimaksudkan untuk mengeluarkan dan memisahkan biji kakao dari kulit buah dan plasentanya. Pemecahan buah harus dilakukan secara hati-hati agar tidak melukai atau merusak biji kakao. Setelah kulitnya terbelah, biji kakao diambil dari belahan buah dan ikatan empulur (plasenta) dengan menggunakan tangan. Biji-biji sehat ini harus segera dimasukkan ke dalam wadah fermentasi karena keterlambatan atau penundaan proses pengolahan dapat berpengaruh negatif pada mutu akibat terjadi pra-fermentasi secara tidak terkendali (Puslitkoka, 2006).

2.3.3 Transportasi

Biji-biji kakao yang telah dikumpulkan ditempatkan pada wadah khusus, kemudian diambil oleh para pekerja dengan menggunakan motor grandong atau truk. Pelaksanaan pengangkutan sebaiknya tidak terlalu lama karena dikhawatirkan akan terjadi fermentasi pendahuluan atau masalah-masalah lain seperti kehujanan.

2.3.4 Fermentasi

Teknologi fermentasi merupakan salah satu cara pengolahan dan pengawetan makanan, baik secara konvensional maupun modern, dengan

memanfaatkan mikroba baik langsung maupun tidak langsung (Misgiyarta *et al.*, 2005). Pentingnya fermentasi pada biji kakao dikarenakan pada proses ini dihasilkan calon senyawa aroma khas coklat. Selain itu selama proses ini terjadi penurunan kadar polifenol yang dapat menurunkan rasa kelat (Yulia *et al.*, 2013). Fungsi fermentasi menurut Pasau (2013), untuk melepas pulp dari biji kakao dan membentuk cita rasa, aroma dan warna biji kakao. Pulp yang tebal berarti mengandung gula yang banyak maka fermentasi gula menghasilkan banyak alkohol, lebih lanjut fermentasi alkohol tersebut menghasilkan asam yang banyak pula. Pada fermentasi kakao terjadi pembentukan alkohol yang selanjutnya diikuti pembentukan asam-asam organik seperti asam laktat dan asam asetat. Terbentuknya asam asetat melalui pemecahan alkohol oleh bakteri asam asetat. Lamanya fermentasi menurut Mulato, *et al.*, (2004) dapat dilakukan 4-5 hari.

2.3.5 Pencucian

Perendaman dan pencucian biji bukan merupakan cara baku, namun dilakukan atas dasar permintaan pasar. Tujuan perendaman dan pencucian adalah untuk menghentikan proses fermentasi, mempercepat proses pengeringan, memperbaiki penampakan biji, dan mengurangi kadar kulit. Biji yang dicuci mempunyai penampakan lebih bagus, namun agak rapuh. Pencucian yang berlebihan menyebabkan kehilangan bobot, biji mudah pecah dan peningkatan biaya produksi. Namun pada biji kakao dari buah yang sudah diperam selama 7-12 hari tidak perlu dicuci karena kadar kulitnya sudah rendah (Puslitkoka, 2006).

2.3.6 Pengeringan

7,5% sehingga aman untuk disimpan. Pengeringan dapat dilakukan dengan tiga cara, yaitu penjemuran, mekanis, dan kombinasi keduanya (Puslitkoka, 2006).

2.3.7 Sortasi Kering

Sortasi biji kering kakao dimaksudkan untuk memisahkan biji kakao berdasarkan ukuran, dan memisahkan dari kotoran atau benda asing lainnya seperti batu, kulit dan daun-daunan. Sortasi dilakukan dengan menggunakan ayakan atau mesin sortasi yang memisahkan biji kakao berdasarkan ukuran. Sesuai dengan SNI biji kakao yang berlaku. Sedangkan menurut Zulkifli dan

Soenaryo (1978), sortasi kering adalah pekerjaan memisah-misahkan biji kakao ke dalam beberapa kelas mutu (*grade*).

2.3.8 Pengepakan dan Penyimpanan

Biji kakao hasil sortasi dikemas dalam karung, dengan berat bersih per karung 60 kg. Setiap karung diberi label yang menunjukkan nama komoditi, jenis mutu dan identitas produsen menggunakan cat dengan pelarut non minyak. Kemudian Biji kakao di simpan di ruangan yang bersih, kelembaban tidak melebihi 75 %, ventilasi cukup, dan tidak dicampur dengan produk pertanian lainnya yang berbau keras karena biji kakao dapat menyerap bau-bauan (Puslitkoka, 2006).

2.4 Fermentasi Kakao

Fermentasi adalah suatu proses perombakan senyawa organik yang dikatalisa oleh enzim. Proses fermentasi berlangsung di dalam suatu sistem biologi yang melibatkan reaksi hidrolisa, reaksi oksidasi reduksi, dan juga menghasilkan energi (Winarno,1992). Fermentasi pada awal sejarahnya hanya digunakan untuk membebaskan biji kakao dari pulp, mencegah pertumbuhan mikroba, memperbaiki kenampakan dan mempermudah pengolahan berikutnya di pabrik coklat. Namun pada perkembangan selanjutnya, fermentasi menjadi proses mutlak yang harus dilakukan. Tujuannya agar diperoleh biji kakao kering yang bermutu baik dan memiliki calon aroma serta citarasa khas coklat. Selain itu selama proses ini terjadi penurunan kadar polifenol yang dapat menurunkan rasa kelat.

Tujuan utama fermentasi adalah untuk mematikan biji sehingga perubahan-perubahan di dalam biji akan mudah terjadi, seperti warna keping biji, serta pembentukan prekursor aroma dan citarasa. Fungsi fermentasi menurut Pasau (2013), untuk melepas pulp dari biji kakao dan membentuk cita rasa, aroma dan warna biji kakao. Pulp yang tebal berarti mengandung gula yang banyak maka fermentasi gula menghasilkan banyak alkohol, lebih lanjut fermentasi alkohol tersebut menghasilkan asam yang banyak pula. Pada fermentasi kakao terjadi pembentukan alkohol yang selanjutnya diikuti pembentukan asam-asam organik

seperti asam laktat dan asam asetat. Terbentuknya asam asetat melalui pemecahan alkohol oleh bakteri asam asetat. Lamanya fermentasi menurut Mulato, *et al.*, (2004) dapat dilakukan 4-5 hari.

2.5 Ekstaksi Polifenol

Metode ekstraksi yang banyak digunakan adalah distilasi dan ekstraksi dengan pelarut. Ekstraksi dipengaruhi oleh lama ekstraksi, suhu, dan jenis pelarut yang digunakan. Semakin lama waktu yang digunakan dan semakin tinggi suhu yang digunakan maka semakin sempurna ekstraksi. Semakin dekat tingkat kepolaran pelarut dengan komponen yang diekstrak, semakin sempurna ekstraksi.

Salah satu teknik ekstraksi polifenol yang digunakan adalah ekstraksi dengan pelarut organik yaitu air dan alkohol 70%. Hal-hal yang perlu diperhatikan mengenai pelarut adalah: (1) pelarut polar akan melarutkan senyawa polar, (2) pelarut organik akan cenderung melarutkan senyawa organik, dan (3) pelarut air cenderung melarutkan senyawa anorganik dan garam dari asam ataupun basa. Prinsip ekstraksi menggunakan pelarut organik adalah bahan yang akan diekstrak dikontakkan langsung dengan pelarut selama selang waktu tertentu, sehingga komponen yang akan diekstrak terlarut dalam pelarut kemudian diikuti dengan pemisahan pelarut dari bahan yang telah diekstrak. Sistem pelarut yang digunakan dalam ekstraksi harus dipilih berdasarkan kemampuannya dalam melarutkan jumlah yang maksimum dari zat aktif dan seminimal mungkin bagi unsur yang tidak diinginkan (List & Schmidt, 1989).

2.6 Pembebasan Lemak Kakao

Biji kakao mengandung lemak cukup tinggi yaitu 45-57%, dipengaruhi kultivarnya (Prawoto dan Sulistyowati, 1991). Pada dasarnya lemak kakao tidak berwarna. Warna kuning gading yang biasa menyertainya disebabkan oleh pigmen karoten yang larut dalam lemak tersebut (Djarmiko dan Widjaya dalam Prawoto dan Sulistyowati, 1991).

Bubuk kakao dibedakan menjadi tiga kelompok berdasarkan kadar lemaknya, yaitu: bubuk kadar lemak rendah (10-12%), medium (13-17%), dan

kadar lemak tinggi (>17-22%) (Mulato dkk. dalam Rosniati, 2010). Bubuk kakao bersifat higroskopis sehingga kandungan lemak yang cukup tinggi akan memudahkan terjadinya reaksi hidrolisis dan oksidasi jika dibiarkan dalam suhu ruang tanpa kemasan (Rosniati, 2010).

Pembebasan lemak kakao dapat dilakukan dengan tiga cara, yaitu pengempaan hidrolis, pengempaan ulir (*expeller press*) dan ekstraksi pelarut. Pengempaan hidrolis dilakukan untuk memisahkan minyak dari bahan yang berkadar minyak tinggi (30-70%), namun cara ini memiliki kelemahan yaitu membutuhkan energi pengepresan yang sangat besar dan banyaknya minyak yang masih terlarut dalam padatan yakni 7-8%. Pengepresan dilakukan hingga bagian cair yang berupa lemak atau minyak keluar dan bagian padat tertinggal. Lemak kakao berkualitas baik biasanya diperoleh melalui pengempaan hidrolis nib bermutu tinggi, sedangkan pengempaan ulir pada nib bermutu rendah atau campuran nib dengan kulit halus serta ekstraksi pelarut terhadap bungkil kakao biasanya akan menghasilkan lemak kakao berkualitas rendah. Sebelum proses pembebasan lemak kakao, dilakukan penghancuran nib kakao terlebih dahulu yang bertujuan untuk mempermudah pembebasan lemak kakao dan penepungan bungkil kakao (Widyotomo *et al.*, 2004).

Cara lain yang dapat dilakukan untuk membebaskan lemak kakao yaitu dengan proses ekstraksi pelarut (Widyotomo *et al.*, 2004). Pelarut yang digunakan seperti petroleum benzen, petroleum eter atau hexan. Benzen merupakan senyawa aromatik tersederhana dengan sumber utamanya ialah alkil benzena (toluene, xilena, etil benzene). Analisis lemak kasar dan bagian-bagian lain yang ikut larut dalam pelarut petroleum benzen, petroleum eter atau hexan yaitu: lemak itu sendiri (trigliserida), phospholipia, asam-asam lemak bebas, sterol-sterol, pigmen, karotin, khlorofil, dan malam (Sriyana *et al.*, 2007).

Minyak atau lemak lain yang memiliki ukuran molekul besar dapat menurunkan aktivitas antibakteri suatu ekstrak karena menjadi penghalang masuknya senyawa antibakteri (senyawa fenolik) kedalam sel bakteri sehingga mengganggu difusi. Naufalin (dalam Nurcahyanti *et al.*, 2011) memperkirakan

adanya interaksi antara lemak dan minyak dengan senyawa antibakteri (minyak atsiri atau senyawa fenolik) sehingga menurunkan aktivitas antibakteri.

2.7 *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans tergolong bakteri gram-positif yang memiliki sifat dan penampilan sangat khas yakni berbentuk bulat yang tumbuh sebagai rantai dan membelah hanya pada satu arah, tetapi belahan itu tetap bersama dan membentuk rantai kokus. Bakteri ini berdinding sel kaku dan tebal yang tersusun dari peptidoglikan dan asam teikoat yang berfungsi mencegah lisis osmotik protoplasma sel (Volk & Wheeler, 1984). *S. mutans* masuk ke dalam genus mutans streptococci. Bakteri ini tumbuh optimal pada suhu sekitar 18°–40°C. Bakteri ini tumbuh dalam suasana fakultatif anaerob.

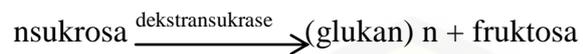
Klasifikasi *S. mutans* adalah sebagai berikut:

- Domain : Bakteri
- Filum : Firmicutes
- Kelas : Bacilli
- Ordo : Lactobacillales
- Famili : Streptococcaceae
- Spesies : *Streptococcus mutans*

(Sumber: National Center for Biotechnology Information, 2013).

Karies gigi ialah kerusakan gigi yang umum pada rongga mulut yang semula terjadi di permukaan gigi kemudian berkembang ke arah dalam sebagai akibat dari fermentasi karbohidrat oleh bakteri. Penyakit ini diawali dengan pembentukan plak pada permukaan email yang terdiri atas endapan gelatin dari glukosa berbobot molekul besar dan disinilah *S. mutans* tumbuh (Brooks *et al.*, 1995). Pada tahap awal karies terdapat area demineralisasi kecil di bawah permukaan enamel yang disebabkan oleh asam laktat hasil dari fermentasi karbohidrat yang dilakukan oleh mikroba. Ketika enamel telah dirusak, karies dapat berkelanjutan sampai dentin dan dalam pulpa. Tahap awal karies ini dapat bersifat reversibel dan dapat terjadi remineralisasi dengan adanya fluoride (Marsh & Martin, 1999).

S. mutans menggunakan sukrosa untuk menghasilkan asam yang mampu mengikis email gigi. *S. mutans* juga menyekresi transferase glukosil ekstrasel melalui proses dekstransukrase yang secara khas membentuk polimer glukosa tidak larut yang besar (misalnya glukon) seperti pada persamaan reaksi berikut:



Glukan melekat erat pada permukaan gigi dan pada bakteri sehingga memudahkan bakteri untuk menempel pada email gigi. Enzim glukosiltransferase selanjutnya merakit glukosa menjadi dekstran. Streptokokus, yang tertanam pada lapisan glukon melakukan fermentasi fruktosa dan menghasilkan asam laktat. Asam laktat ini menyebabkan dekalsifikasi (penyusutan kapur) dan pembusukan pada gigi (Volk & Wheeler, 1984). Semakin banyak jumlah *S. mutans* dalam plak akan mengakibatkan semakin banyaknya produksi asam dan dengan demikian peningkatan demineralisasi tetap berlangsung (Marsh & Martin, 1999).

2.8 Mekanisme Penghambatan Polifenol Terhadap *S. mutans*

Mekanisme polifenol sebagai agen antibakteri berperan sebagai toksin dalam protoplasma, merusak dan menembus dinding sel serta mengendapkan protein sel bakteri. Sifat antibakteri polifenol didapat dari senyawa katekin dan proantosianidin yang terdapat dalam polifenol. Katekin adalah senyawa polifenol alami yang merupakan metabolit sekunder dan termasuk dalam penyusun golongan tanin, sedangkan proantosianidin adalah nama lain dari tanin yang terkondensasi (Lestari, 2009). Tanin mempunyai daya antibakteri dengan cara mempresipitasikan protein serta mempunyai efek yang sama dengan senyawa fenolat. Secara umum efek antibakteri tanin adalah bereaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim dan destruksi atau inaktivasi fungsi materi genetik bakteri (Masduki dalam Grandiosa, 2010). Selain katekin dan proantosianidin, sifat antibakteri polifenol juga didapat dari senyawa antosianin yang merupakan golongan pigmen yang disebut flavonoid (Wollgast dan Anklam, 2001). Özçelik *et al.* (2008) menyatakan bahwa tidak ada perbedaan daya antibakteri dari berbagai jenis flavonoid yang berasal dari sumber yang berbeda. Flavonoid merupakan golongan terbesar dari senyawa fenol dan memiliki mekanisme kerja

dalam menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara menginaktivasi protein enzim pada membran sel sehingga mengakibatkan struktur protein menjadi rusak. Ketidakstabilan pada dinding sel dan membran sitoplasma bakteri akan mengakibatkan fungsi permeabilitas selektif, fungsi pengangkutan aktif, pengendalian susunan protein dari sel bakteri menjadi terganggu, sehingga akan menyebabkan hilangnya makromolekul dan ion dari sel, sehingga sel bakteri menjadi kehilangan bentuk dan selanjutnya akan terjadi lisis (Singh dalam Rinawati, 2010).

Proses antibakteri *S. mutans* dapat dibedakan menjadi 4, yaitu dengan penghambatan sintesis dinding bakteri, mengganggu permeabilitas membran bakteri, proses persaingan untuk mendapatkan makanan, mengganggu jalannya sintesis protein, dan penghambatan produksi asam nukleat. Proses antibakteri yang pertama ialah dengan proses penghambatan sintesis dinding bakteri, sehingga *S. mutans* yang memiliki lapisan peptidoglikan yang relatif tebal (gram positif) akan lisis. Proses antibakteri yang kedua ialah proses yang mengganggu permeabilitas bakteri. Permeabilitas membran sel bakteri yang terganggu akan dapat menyebabkan makromolekul dan ion akan terlepas dari bakteri sehingga bakteri akan mengalami kematian. Proses antibakteri yang ketiga ialah dengan cara mengganggu jalannya sintesis protein yang berlangsung di dalam tubuh bakteri. Protein di dalam tubuh bakteri diperlukan untuk membentuk RNA yang berfungsi dalam metabolisme dan replikasi bakteri, sehingga sintesis protein yang terganggu akan mengakibatkan protein yang non fungsional, sehingga bakteri tidak dapat menjalankan proses metabolisme dan replikasi yang dapat menyebabkan kematian. Proses antibakteri yang keempat ialah melalui penghambatan produksi asam nukleat. Asam nukleat ini diperlukan untuk replikasi bakteri, sehingga bakteri yang tidak mampu mensintesis asam nukleat akan mati (Brooks *et al.*, 2007).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia dan Biokimia Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember, Laboratorium Rekayasa Proses Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember dan Laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember. Waktu penelitian dimulai pada bulan Januari 2014 sampai Januari 2015 dan Juni 2017 sampai Juli 2017.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan adalah biji kakao jenis lindak tidak terfermentasi dan biji kakao terfermentasi dari PTPN XII Kebun Kalikempit kabupaten Banyuwangi, etanol 70%, petroleum benzena, akuades, kain saring, benang wol, kertas saring, aluminium foil, label, pereaksi Follin Ciocalteu, larutan Na_2CO_3 , aseton, larutan katekin, akuades steril, spiritus, NB (*Nutrient Broth*), NA (*Nutrient Agar*), alkohol 70%, dan kultur *Streptococcus mutans*, DMSO 2%, larutan ekstrak polifenol dan tissue

3.2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan adalah oven, timbangan analitik, blender, pengepres hidrolis, erlenmeyer, beaker glass, labu ukur, tabung reaksi, gelas ukur, penangas air, pipet mikro, *blue tip*, spatula, magnet stirer, *cutter*, *shaker water bath* dan cawan petri, pemanas bunsen, *ependorf*, spektrofotometri UV-Vis, kuvet, stirer 5 cm, pemanas listrik, laminar air flow, inkubator, *colony counter*, autoklaf, mortar dan penumbuk, dan ose.

3.3 Pelaksanaan Penelitian

3.3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode deskriptif, yaitu sebuah penelitian yang bertujuan untuk memberikan atau menjabarkan suatu

keadaan atau fenomena yang terjadi saat ini dengan menggunakan prosedur ilmiah untuk menjawab masalah secara aktual (Sugiyono, 2011).

Pada penelitian ini biji kakao yang digunakan yaitu biji kakao superior tidak terfermentasi (H0) dan biji kakao fermentasi selama 4 hari(H4). Penelitian ini dilakukan dalam dua tahap yaitu ekstraksi bubuk polifenol kasar biji kakao dan uji penghambatan ekstrak polifenol biji kakao terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans*. Data hasil penelitian ini disusun dalam table, kemudian dirata – rata dan disajikan dalam bentuk grafik kemudian diinterpretasikan sesuai hasil yang diperoleh.

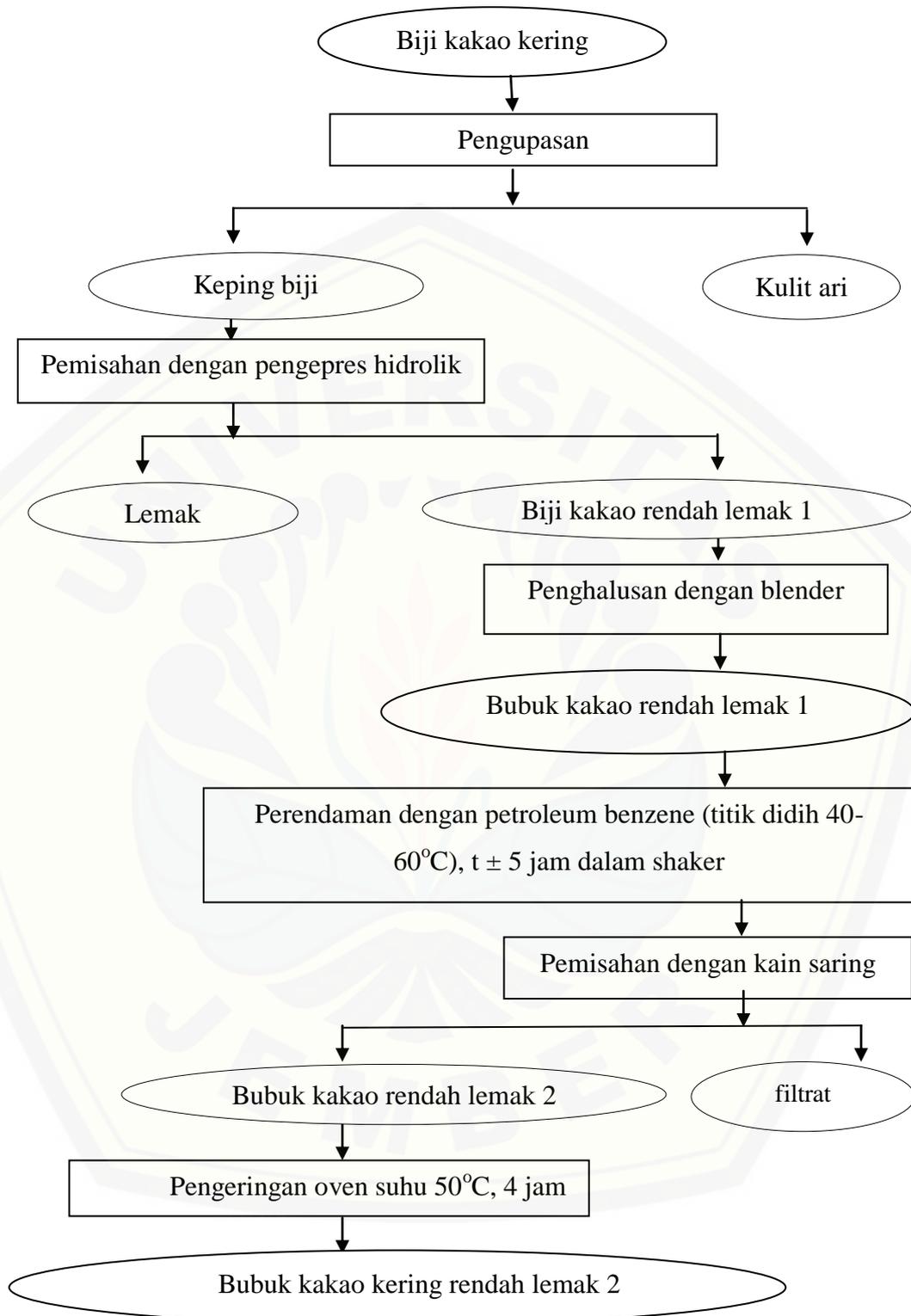
3.3.2 Tahapan Penelitian

Penelitian ini terdiri atas dua tahap. Tahap pertama yaitu ekstraksi bubuk polifenol kasar biji kakao tidak terfermentasi dan terfermentasi. Penelitian tahap kedua yaitu dilakukan uji total polifenol dan uji penghambatan ekstrak polifenol biji kakao tidak terfermentasi dan biji kakao terfermentasi terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans*.

a. Pembuatan bubuk kakao kering rendah lemak 2

Biji kakao kering yang diperoleh dari PTPN XII Kebun Kalikempit dilakukan pengupasan untuk memisahkan keping biji dengan kulit arinya. Keping biji tersebut dilakukan pemisahan lemak dengan menggunakan pengepres hidrolis dan dihasilkan biji kakao rendah lemak 1. Biji kakao yang telah dipres, dihaluskan menggunakan blender sehingga diperoleh bubuk kakao rendah lemak 1.

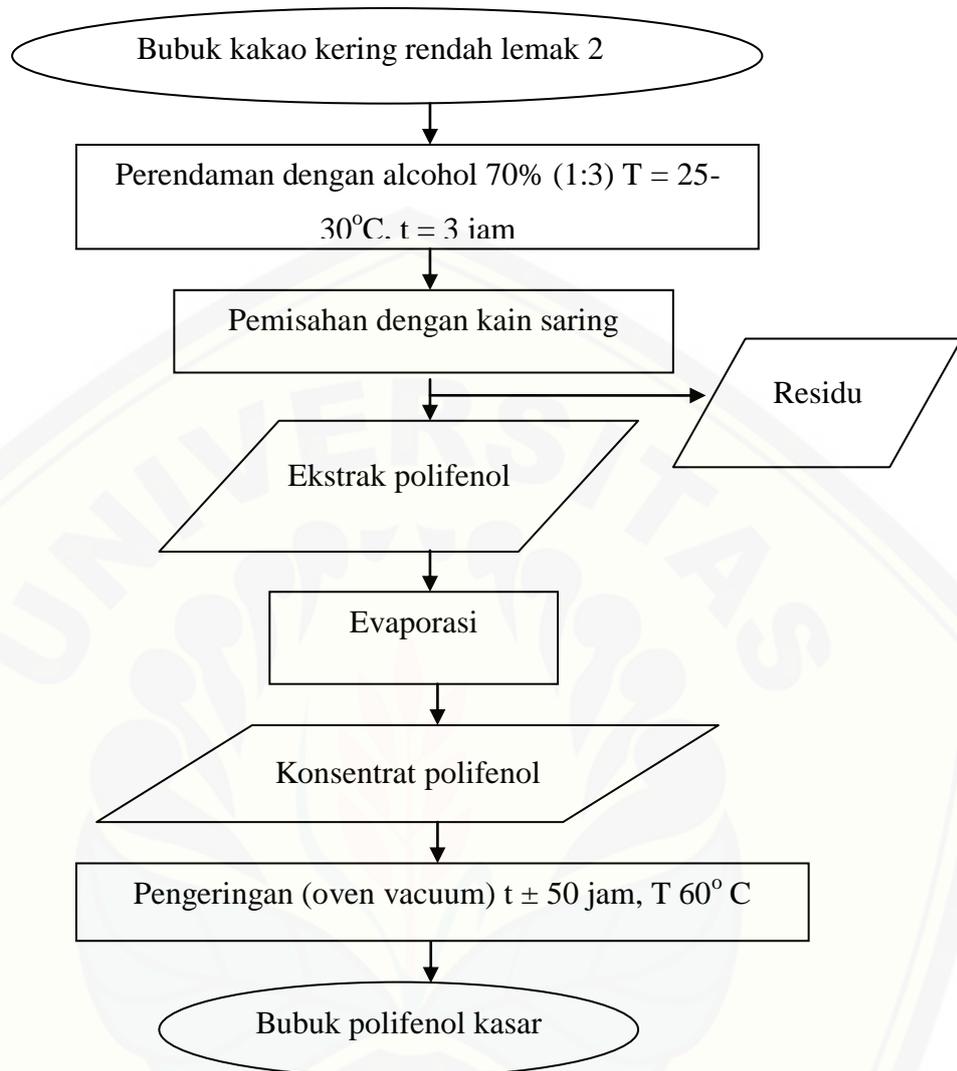
Bubuk kakao rendah lemak 1 yang dihasilkan dibungkus dengan kertas saring dan diikat dengan benang wol, dan direndam dalam toples kaca yang berisi petroleum benzene. Perendaman dilakukan dalam shaker pada suhu 60⁰C selama 5 jam, dan dilanjutkan penyaringan. Penyaringan ini bertujuan untuk memisahkan padatan bubuk kakao rendah lemak 2 dan filtrat. Bubuk kakao rendah lemak 2 yang dihasilkan, dikeringkan dalam oven selama ± 2 jam pada suhu 50 °C, sehingga dihasilkan bubuk kakao kering rendah lemak 2. Proses pembuatan bubuk kakao kering rendah lemak 2 dapat dilihat pada **Gambar 3.1**



Gambar 3.1 Proses pembuatan bubuk kakao kering rendah lemak 2

b. Pembuatan bubuk polifenol

Pembuatan bubuk polifenol kasar diawali dengan ekstraksi polifenol dari bubuk kakao rendah lemak 2 menggunakan alkohol 70% selama 3 jam dengan perbandingan 1:3 (bahan dan pelarut) pada suhu 25-30°C dalam *shaker water bath*. Sampel yang telah direndam dengan alkohol kemudian disaring menggunakan kain saring untuk memisahkan ekstrak polifenol dengan residu. Larutan yang mengandung polifenol dievaporasi menggunakan evaporator berputar dalam keadaan vakum dengan suhu 45°C sehingga dihasilkan konsentrat polifenol. Konsentrat polifenol dikeringkan menggunakan oven vacuum selama ± 50 jam pada suhu 60°C sehingga dihasilkan bubuk polifenol kasar. Pembuatan bubuk polifenol kasar selengkapnya dapat dilihat pada **Gambar 3.2**.



Gambar 3.2 Diagram alir proses pembuatan bubuk polifenol kasar

c. Regenerasi kultur mikroba

Menyiapkan tabung reaksi untuk setiap kultur bakteri, dan tambahkan media NA sebanyak 5 ml ke dalam tabung reaksi lalu disterilisasi. Tabung reaksi berisi media yang telah disterilkan kemudian dimiringkan dan ditunggu hingga padat. Tabung yang berisi agar miring NA diberi goresan 1 ose isolate bakteri *Streptococcus mutans* lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 48-72 jam.

3.3.3 Variabel Pengamatan

Variabel pengamatan yang dilakukan pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a. Total polifenol (Metode *Follin-Ciocalteu*)
- b. Uji penentuan konsentrasi hambatan minimum (KHM) pada bakteri *Streptococcus mutans*.

3.3.4 Prosedur Analisis

a. Total polifenol (Metode *Follin-Ciocalteu*)

Analisa total polifenol ditentukan secara spektrofotometri menggunakan Metode *Follin-Ciocalteu* (Singelton dan Rossi, 1965). sebanyak 0,125 gram sampel ekstrak polifenol dilarutkan dengan 20 ml aseton 80%, kemudian dimasukkan dalam beaker glass dan ditutup aluminium foil selanjutnya distirer selama 30 menit. Kemudian dilakukan penyaringan dengan kertas saring pada labu ukur 25ml. Semua alat gelas yang digunakan dibilas dengan aseton 80% untuk melepaskan aseton yang mengandung ekstrak polifenol, kemudian di tera. Sebanyak 125 μ l ekstrak diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 8750 μ l aquades. Setelah itu ditambah 625 μ l reagen *Follin-Ciocalteu* 2N dan divortex selama 2 menit, didiamkan selama 2 menit. Kemudian ditambah 1875 μ l larutan Na_2CO_3 jenuh untuk menginisiasi pembentukan warna, didiamkan selama 2 jam untuk pengembangan warna biru yang terbentuk. Setelah itu dilakukan pengukuran absorbansi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 765 nm.

Pembuatan kurva standar untuk perhitungan polifenol dibuat dengan cara yang sama yaitu menggunakan larutan standart (+)-katekin (3000 ppm), kemudian dibuat larutan pada konsentrasi (0; 150; 300; 450; 600; 750 ppm) sebanyak 1000 μ l dengan aseton 80%, kemudian diambil 125 μ l dan ditambah dengan 8750 μ l aquadest, selanjutnya ditambah 625 μ l reagen *Follin-Ciocalteu* 2N dan divortex selama 2 menit, didiamkan selama 2 menit, selanjutnya ditambahkan 1875 μ l Na_2CO_3 jenuh, didiamkan selama 2 jam, kemudian dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 765 nm.

Analisa kandungan total polifenol pada sampel dihitung berdasarkan kurva standar katekin yang diperoleh. Nilai absorbansi (y) dimasukkan pada persamaan kurva standar katekin, sehingga diperoleh nilai X dari persamaan kurva standar

yang kemudian dikali volume total, lalu hasil perhitungan dibagi dengan berat sampel yang digunakan untuk analisa.

$$\text{Total polifenol} = \frac{X \times \text{Volume total}}{\text{Berat sampel}}$$

b. Uji penentuan Konsentrasi Hambatan Minimum (KHM) pada bakteri *Streptococcus mutans*.

i. Pembuatan kontrol

Penelitian ini menggunakan kontrol negatif (0%) sebagai pembanding. Pembuatan kontrol negatif dengan menggunakan media cair yang ditambahkan DMSO 20 μ l dan larutan fisiologis sebanyak 980 μ l serta ditambahkan 200 μ l suspensi mikroba, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C.

ii. Tahap penyiapan sampel

Tahap pertama yang dilakukan pada penyiapan sampel yaitu sterilisasi semua peralatan dan bahan (kecuali DMSO dan ekstrak polifenol) menggunakan autoklaf dengan suhu 121⁰C dan tekanan 1 atm selama 15 menit. Pembuatan larutan uji yaitu dengan membuat stok polifenol dengan cara melarutkan sebanyak 2 gram ekstrak polifenol dengan 10 ml akuades steril. Pada pengujian KHM digunakan ekstrak polifenol dengan konsentrasi uji 0%; 0,6%;1%; 1,6%; dan 2%. Pembuatan larutan uji yaitu dengan membuat stok polifenol dengan cara melarutkan sebanyak 2 gram ekstrak polifenol dengan 10 ml akuades steril. Larutan uji secara berturut-turut dibuat dengan cara mengambil masing-masing ekstrak polifenol sebanyak 100 μ l, 150 μ l, 250 μ l, 400 μ l, dan 500 μ l. Kemudian masing-masing ditambah DMSO2% sebanyak 20 μ l yang berfungsi untuk melarutkan ekstrak polifenol lebih maksimal, dan ditambah dengan 680 μ l; 630 μ l; 530 μ l; 380 μ l; dan 280 μ l larutan fisiologis, lalu divortex sampai benar-benar larut. Pada saat akan dilakukan uji ditambahkan dengan media NA yang masih hangat (cair). Selain itu, disiapkan pula bakteri yang akan digunakan untuk pengujian yaitu

pengambilan 1 ose bakteri dari agar miring dimasukkan pada media NB 1 ml kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

iii. **Penentuan konsentrasi hambatan minimum (KHM)**

Penentuan KHM dilakukan dengan metode dilusi agar dengan menggunakan media NA untuk *Streptococcus mutans*. Metode ini memiliki keuntungan yaitu satu konsentrasi senyawa uji dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji. Penentuan KHM untuk *Streptococcus mutans* dengan penghitungan koloni bakteri. Media NA yang masih hangat ditambah larutan uji dengan perbandingan (4:1) hingga diperoleh kadar larutan uji dalam media sebesar 0,6%; 1%; 1,6%; dan 2% (v/v). Campuran media dan larutan uji kemudian dimasukkan dalam cawan petri yang telah berisi 200 µl suspensi mikroba (pengenceran¹⁰⁻⁵) diratakan dan dibiarkan memadat kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam kemudian dihitung pertumbuhan mikroba dengan colony counter. Konsentrasi terkecil yang mampu menurunkan jumlah koloni dari total koloni yang terdapat pada kontrol negatif ditetapkan sebagai KHM, sedangkan konsentrasi yang menurunkan 50% jumlah koloni dari total koloni mikroba yang terdapat pada *control negative* ditetapkan sebagai IC₅₀.

iv. **Tahap pengamatan**

Penentuan KHM dan IC₅₀ terhadap pertumbuhan *S. mutans* dilakukan dengan cara menghitung koloni bakteri menggunakan *colony counter*. Penentuan % penghambatan pada masing-masing konsentrasi uji yang didapatkan dinyatakan dalam sebuah grafik

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini didapatkan beberapa kesimpulan sebagai berikut:

1. Total polifenol pada sampel H0 (ekstrak polifenol biji kakao tidak terfermentasi) yaitu 284,56 mg/g dan sampel H4 (ekstrak polifenol biji kakao terfermentasi) yaitu 177,63 mg/g.
2. Nilai KHM dan IC50 ekstrak polifenol biji kakao terhadap *Streptococcus mutans* menggunakan 2 metode perhitungan yaitu perhitungan kurva reguler dan perhitungan kurva logaritmik adalah : untuk (a) perhitungan kurva reguler H0 8,1 mg/ml dan 0,746 mg/ml, dan H4 9,64 mg/ml dan 0,605 mg/ml. (b) kurva logaritmik H0 0,85772 mg/ml dan 0,25263 mg/ml sedangkan H4 0,86573 mg/ml dan 0,26061 mg/ml.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui potensi ekstrak polifenol biji kakao tidak terfermentasi dan terfermentasi sebagai antimikroba terhadap bakteri dan sebagai antikapang.

DAFTAR PUSTAKA

- Arunachalam, M., Raj, M. M., Mohan, N., Mahadevan, A. 2003. Biodegradation of Catechin. *Indian natn Sci Acad.* B69. Vol. 4: 353-370.
- Brooks, G.F., Butel, J.S., Morse, S. A. 1995. *Mikrobiologi Kedokteran Jawetz, Melnick, & Adelberg. (Edisi 20)*. Jakarta : Penerbit buku Kedokteran EGC
- Brooks, G.F., Butel, J.S., Morse, S.A. 2004. *Mikrobiologi Kedokteran Jawatz, Melnick, & Adelberg. (Edisi 23)*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC
- Brooks, G. F., Butel, J. S., dan Morse, S. A. 2007. *Mikrobiologi Kedokteran Jawetz, Melnick, and Adelberg. 23th edition*. Jakarta: EGC.
- Ditjen Pengolahan dan Pemasaran Hasil Pertanian. 2013. *Profil olahan kakao Indonesia*. Jakarta : Departemen Pertanian
- Ernawati. 2015. Aktivitas Ekstrak Polifenol Biji Kakao Superior Dan Inferior Dari PTPN XII Kebun Kalikempit-Banyuwangi Sebagai Sumber Antioksidan Dan Antibakteri. *Skripsi*. FTP : Universitas jember
- Grandiosa, R. 2010. *Efektivitas Penggunaan Larutan Filtrat Jintan Hitam (Nigellasativa) dengan Konsentrasi Berbeda terhadap Pertumbuhan Bakteri Aeromonas hydrophila secara In-vitro dan Uji Toksisitasnya terhadap Ikan Mas (Cyprinus carpio)*. Bandung: Universitas Padjajaran press.
- Jalil, A.M.M dan Ismail, A. 2006. Polyphenol In Cocoa Product Between Antioxidant Properties And Health. *Journal Review Molecules*. Vol. 13:2019-2219.

- Janecki, A., & Kolodziej, H. 2010. Anti-Adhesive Activities of Flavan-3-ols and Proanthocyanidins in the Interaction of Group A-Streptococci and Human Epithelial Cells. *Journal Molecules*. Vol. 15: 7139-7152.
- Karou, D., Dicko, M. H., Simporé, J., Traore, A. S. 2005. Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *Journal of Biotechnology*. Vol. 4 (8): 823-828.
- Lestari, C., Widjijono, dan Murdiastuti, K. 2009. Pengaruh Ekstrak Gambir Terstandarisasi (*Uncaria Gambir* (Hunter) Roxb) sebagai Periodontal Dressing terhadap Penyembuhan Luka Gingiva Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*). *Majalah Kedokteran Gigi*. Vol 16 (1): 8.
- List, P.H., & Schmidt, P.C. 1989. *Phytopharmaceutical Technology*. Florida: CRC Press.
- Marsh, P., & Martin, M.V. 1999. *Oral Microbiology*. (Fourth Edition). Oxford: Reed Educational and Professional Publishing Ltd.
- Misgiyarta, S dan Widowati. 2005. *Seleksi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat (BAL) Indigenus*. Bogor: Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian.
- Misnawi, Jinap, S., Jamilah, B., & Nazamid, S. 2003. Effect of Cocoa Liquor Roasting on Polyphenol Content, Hydrophobicity Astringency. *ASEAN Food Journal*. Vol. 12 (2): 103-113.
- Misnawi. 2005. Peranan Pengolahan terhadap Pembentukan Cita Rasa Cokelat. *Warta Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia*. Vol. 21 (3): 136-144.
- Misnawi, Sumartono. Wahyudi. Ismayadi, Riyanto, dan Zakaria. 2008. "Aspek Kesehatan Biji Kakao dan Hasil-Hasil penelitian (Health Aspects of Cocoa Beans and Recent Result of Research)". Tidak Dipublikasikan. Makalah. Jember: Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia

- Mulato, S. dan Widyotomo, S. 2004. *Petunjuk Teknis Pengolahan Produk Primer Dan Sekunder Kakao*. Jember : Pusat penelitian Kopi dan Kakao Indonesia
- Nam-Young, K., Min-Kyung, J., Dong-Geun, L., Ki, H. Y., HyeJi, J., Mihyang, K., Sung, G. K., Byung, H. Y., Sang-Hyeon, L. 2010. Comparison of Methods for Proanthocyanidin Extraction from Pine (*Pinus densiflora*) Needles and Biological Activities of The Extracts. *Nutrition Research and Practice*. Vol. 4 (1): 16-22.
- Nurchayanti, A. D. R., Dewi, L., dan Timotius, K.H. 2011. Antioksidan dan Antibakteri Ekstrak Polar dan Non Polar Biji Selasih (*Ocimum sanctum* Linn). *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. Vol. 22 (1).
- Özçelik, Orhan, Özgen, dan Ergun. 2008. Antimicrobial Activity of Flavonoids against Extended-Spectrum β -Lactamase (ES β L)-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 7 (4): 1151-1157.
- Pasau, Caturina. 2013. Efektivitas Penggunaan Asam Asetat Pada Pemeraman Biji Kakao Segar Sebagai Analog Fermentasi. *Jurnal Agrotekbis*. ISSN 2338-3011. Vol. 1 (2): 113-120.
- Prawoto, A. A. dan Sulistyowati. 1991. Sifat-sifat Fisiko-Kimia Lemak Kakao dan Faktor-faktor yang Berpengaruh. *Pusat Penelitian Perkebunan Jember*. Vol. 7 (2): 142-158.
- Puslitkoka. 2006. *Standar Prosedur Operasional (SPO) Pengolahan Kakao*. Jember: Pusat Penelitian Kopi dan Kakao.
- Reyhan, P. S. R. 2014. Produksi Polifenol Dari Olahan Primer Biji Kakao Bulk Sebagai Senyawa Antioksidan Dan Antimikroba. *Skripsi*. FTP : Universitas Jember

- Ridwan, M. 2007. "Proses Pengolahan Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) di PT. Perkebunan Nusantara XII (PERSERO) Kalitelepak Glenmore, Banyuwangi". *Laporan Kuliah Kerja*. Jember: FTP Universitas Jember.
- Rinawati, N. D. 2010. *Daya Antibakteri Tumbuhan Majapahit (*Crescentia cujete* L.) terhadap Bakteri *Vibrio alginolyticus**. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh November.
- Rosniati. 2010. Pengaruh Jenis Kemasan dan Lama Penyimpanan terhadap Mutu Bubuk Kakao. *Jurnal Industri Hasil Perkebunan*. Vol. 5 (1): 115-121.
- Singleton, V.L dan Rossi, J.A. 1965 Colorimetry of Total Phenolic with Phosphomolibdic-Phosphotungstic Acid Reagent. *Journal Enologi andViticulture*. Vol. 16:147
- Siregar, T. H. S., Slamet., R., dan Laeli, N. 2003. *Pembudidayaan, Pengolahan dan Pemasaran Cokelat*. Cetakan ke-13. Jakarta: PT. Penebar Swadaya.
- Soenaryo, S. 1988. Pengaruh Lama Fermentasi dan Perendaman Terhadap Mutu Lemak Kakao. *Jurnal Pelita Perkebunan*. Vol. 4(2):73-80
- Sriyana, Umi yasih, U., dan Krishna, N. H. 2007. *Petunjuk Teknis Pemanfaatan Bensin Sebagai Bahan Pengganti Ekstraksi Pada Analisis Kadar Lemak* . Pasuruan: Loka Penelitian Sapi Potong.
- Sunanto, H. 1992. *Cokelat: Budidaya, Pengolahan Hasil, dan Aspek Ekonominya*. Yogyakarta : Kanisius.
- Susanto, F.X. 1994. *Tanaman Kakao – Budidaya dan Pengolahan Hasil*. Kanisius. Yogyakarta.
- Trilaksani, W. 2003. *Antioksidan :Jenis, Sumber, Mekanisme Kerja dan Peran Terhadap Kesehatan*. Bogor : Institut Pertanian Bogor.

- Volk, W. A., & Wheeler, Margaret F. 1984. *Mikrobiologi Dasar Jilid 2. (Edisi Kelima)*. Jakarta: Penerbit Erlangga
- Wahyudin, Ateng. 2012. "Ekstraksi Zat Antimikroba (Polifenol) Biji Kakao (Theobroma Cacao L) Terserang Phytophthora Palmivora Dengan Variasi Pelarut." Tidak Diterbitkan. *Skripsi*. Jember: Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.
- Widyatomo, S., Sri-Mulato, dan Suharyanto, E. 2004. Pemecahan Buah dan Pemisahan Biji Kakao secara Mekanis. *Warta Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia*. Vol. 20 (3): 138-143.
- Widyotomo, S., Mulato, S., Handaka. 2006. *Teknologi Pengolahan Biji Kakao Bulk dan Edel*. Jember: Pusat Penelitian Kopi dan Kakao
- Winarno, F. G., 1992. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: Gramedia.
- Wollgast, J dan Anklam, E. 2000. Review on Polyphenols in Theobroma Cacao Changes in Composition During the Manufacture of Chocolate and Methodology for Identification and Quantification. *Food Research International*, 33, 423-447.
- Wollgast, Pallaroni, Agazzi, dan Anklam. 2001. Analysis of Procyanidins in Chocolate by Reserved-Phase High Performance Liquid Chromatography With Electrospray Ionization Mass Spectrometric and Tandem Mass Spectrophotometric Detection. *Journal of Chromatography A*. 926: 211-220.
- Yulia, Delfahedah., Syukur S. dan Jamsari. 2013. Isolasi Karakterisasi dan Identifikasi dan Bakteri Asam Laktat (BAL) yang Berpotensi sebagai Antimikroba rari Fermentasi Kakao Varietas Hibrid (Trinitario). *Jurnal Kimia Unud*. ISSN 2303-3401. Vol.2 (2): 92-102.

Zulkifli, Mansur dan Sunaryo. 1978. *Pengolahan Coklat pada Perkebunan Besar.*

Jember: Balai Penelitian Perkebunan Bogor Sub Balai Penelitian
Budidaya.

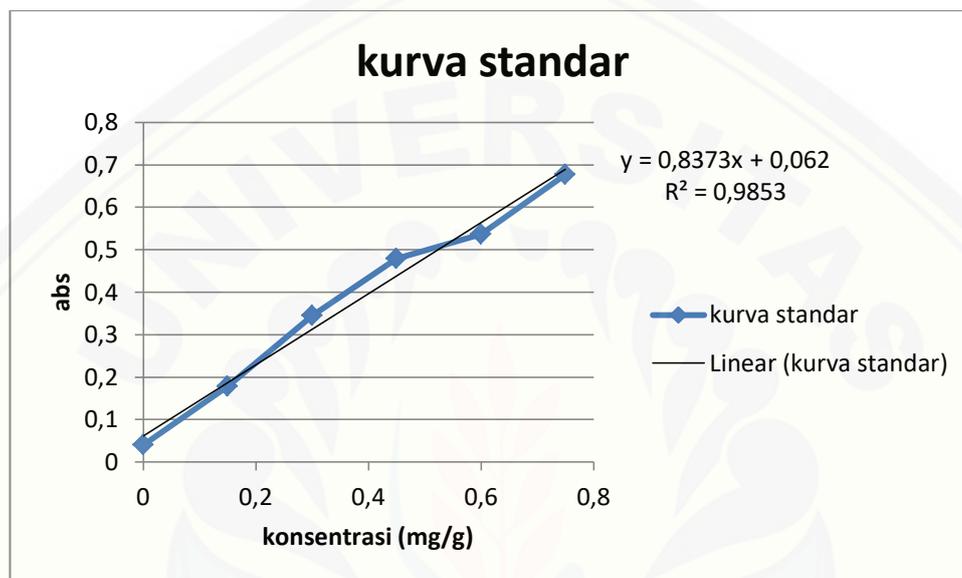


LAMPIRAN

A. Data Hasil Analisis Total Polifenol Bubuk Polifenol Biji Kakao Terfermentasi dan Tidak Terfermentasi

Sampel	Ulangan	Nilai Abs	a	b	x	FP	W (g)	Total Polifenol (mg/g)	Rata-rata
H0	1	1,114	0,8373	0,062	1,256	25	0,125	251,284	284,565
	2	1,410	0,8373	0,062	1,610	25	0,125	321,987	
	3	1,236	0,8373	0,062	1,402	25	0,125	280,425	
H4	1	1,112	0,8373	0,062	1,254	25	0,125	250,806	177,634
	2	0,719	0,8373	0,062	0,785	25	0,125	156,933	
	3	0,586	0,8373	0,062	0,626	25	0,125	125,164	

Konsentrasi	Absorbansi
0	0,040
0,15	0,178
0,3	0,345
0,45	0,479
0,6	0,537
0,75	0,677



Kurva standar katekin

B. Perhitungan Hambatan Minimum *Streptococcus mutans***Pembuatan larutan uji**

Polifenol (%)	Polifenol (µl)	DMSO (µl)	Larfis (µl)	m.o (µl)	NA (µl)	total volume (µl)
0	0	20	780	200	4000	5.000,000
0,4	100	20	680	200	4000	5.000,000
0,6	150	20	630	200	4000	5.000,000
1	250	20	530	200	4000	5.000,000
1,6	400	20	380	200	4000	5.000,000
2	500	20	280	200	4000	5.000,000

Data Awal KHM *S. mutans* (10^5)

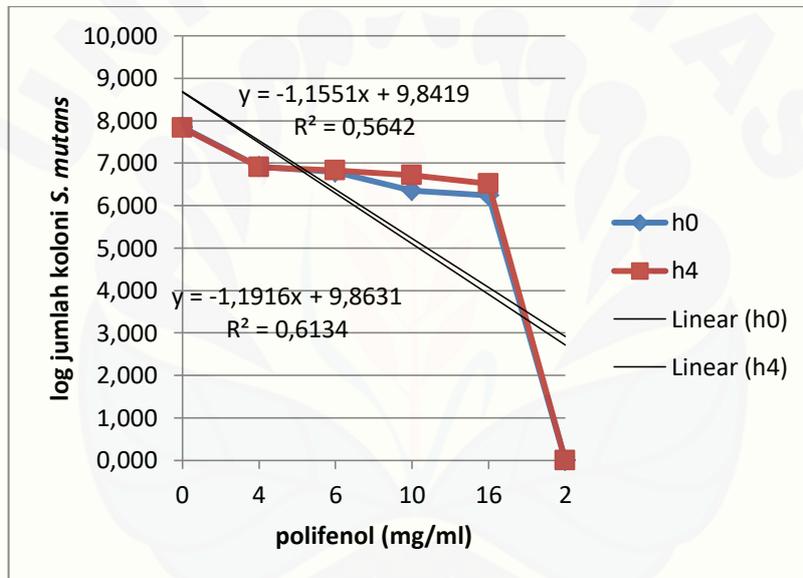
sampel	Polifenol (mg/ml)	jumlah koloni/200µl (U1)	jumlah koloni/200µl (U2)	rata-rata	SD
h0	0	144	138	141,00	4,24
	4	7	26	16,50	13,44
	6	11	14	12,50	2,12
	10	8	1	4,50	4,95
	16	3	4	3,50	0,71
	20	0	0	0,00	0,00
h4	0	153	117	135,00	25,46
	4	32	0	16,00	22,63
	6	27	0	13,50	19,09
	10	1	20	10,50	13,44
	16	13	0	6,50	9,19
	20	0	0	0,00	0,00

Data S. mutans dalam CFU (10^5)

sampel	polifenol (mg/ml)	jumlah koloni (CFU/ml) (U1)	jumlah koloni (CFU/ml) (U2)	rata-rata (CFU/ml)	log jumlah koloni	SD	% penghambatan
H0	0	7,20E+07	6,90E+07	7,05E+07	7,848	2,E+06	0,00
	4	3,50E+06	1,30E+07	8,25E+06	6,916	7,E+06	88,30
	6	5,50E+06	7,00E+06	6,25E+06	6,796	1,E+06	91,13
	10	4,00E+06	5,00E+05	2,25E+06	6,352	2,E+06	96,81
	16	1,50E+06	2,00E+06	1,75E+06	6,243	4,E+05	97,52
	20	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	#NUM!	0,E+00	100,00
H4	0	7,65E+07	5,85E+07	6,75E+07	7,829	1,E+07	0,00
	4	1,60E+07	0,00E+00	8,00E+06	6,903	1,E+07	88,15
	6	1,35E+07	0,00E+00	6,75E+06	6,829	1,E+07	90,00
	10	5,00E+05	1,00E+07	5,25E+06	6,720	7,E+06	92,22
	16	6,50E+06	0,00E+00	3,25E+06	6,512	5,E+06	95,19
	20	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	#NUM!	0,E+00	100,00

Kurva logaritmik penghambatan *S. mutans*

sampel	polifenol (mg/ml)	log jumlah koloni
h0	0	7,848
	4	6,916
	6	6,796
	10	6,352
	16	6,243
	2	0,000
h4	0	7,829
	4	6,903
	6	6,829
	10	6,720
	16	6,512
	20	0,000



Kurva logaritmik

Sampel H0

IC₅₀

$Y1 = 1 \times 10^5$

$Y2 = 50\%(Y1) = 5 \times 10^4$

$\log Y1 = 5$

$\log Y2 = 4,698970004$

polifenol (mg/ml)

$X1 = 4,191758$

$X2 = 4,452368$

IC₅₀ 0,26061

IC₉₀

$Y1 = 1 \times 10^5$

$Y2 = 90\%(Y1) = 9 \times 10^4$

$\log Y1 = 5$

$\log Y2 = 4,954242509$

polifenol (mg/ml)

$X1 = 5,057484$

$X2 = 5,92321$

IC₉₀ 0,86573

Sampel H4

IC₅₀

$Y1 = 1 \times 10^5$

$\log Y1 = 5$

$Y2 = 50\%(Y1) = 5 \times 10^4$

$\log Y2 = 4,698970004$

Polifenol (mg/ml)

$X1 = 4,081151$

$X2 = 4,333778$

IC₅₀ 0,25263

IC₉₀

$Y1 = 1 \times 10^5$

$\log Y1 = 4$

$Y2 = 90\%(Y1) = 9 \times 10^4$

$\log Y2 = 3$

Polifenol (mg/ml)

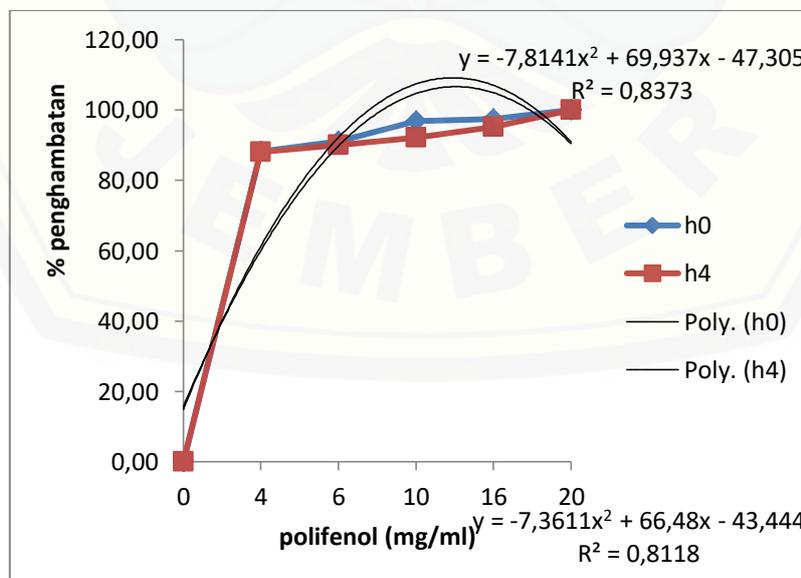
$X1 = 4,901848$

$X2 = 5,759567$

IC₉₀ 0,85772

Kurva Reguler Penghambatan Pertumbuhan *S. mutans*

sampel	polifenol (mg/ml)	% penghambatan
h0	0	0,00
	4	88,30
	6	91,13
	10	96,81
	16	97,52
	20	100,00
h4	0	0,00
	4	88,15
	6	90,00
	10	92,22
	16	95,19
	20	100,00



Kurva regular Penghambatan Pertumbuhan *S. mutans*

Sampel H0

Nilai IC₅₀ di dapat dari persamaan berikut

$$y = -7,8141x^2 + 69,937x - 47,305$$

$$50\% = -7,8141x^2 + 69,937x - 47,305$$

$$0,5 = -7,8141x^2 + 69,937x - 47,305$$

$$x^2 + 8,949x + 6,117$$

$$(x - 8,2) (x - 0,746)$$

$$x = 8,2$$

$$x = 0,746$$

**IC₅₀ = 0,746
mg/ml**

Nilai IC₉₀ di dapat dari persamaan berikut

$$y = -7,8141x^2 + 69,937x - 47,305$$

$$90\% = -7,8141x^2 + 69,937x - 47,305$$

$$0,9 = -7,8141x^2 + 69,937x - 47,305$$

$$x^2 + 8,949x + 6,168$$

$$(x - 8,1) (x - 0,761)$$

$$x = 8,1$$

$$x = 0,761$$

IC₉₀ = 8,1 mg/ml

Sampel H4

Nilai IC₅₀ di dapat dari persamaan berikut :

$$y = -7,361x^2 + 66,48x + 43,44$$

$$50\% = -7,361x^2 + 66,48x + 43,44$$

$$0,5 = -7,361x^2 + 66,48x + 43,44$$

$$x^2 - 9,031x - 5,833$$

$$(x + 0,605) (x - 9,64)$$

$$x = 0,605$$

$$x = 9,64$$

IC₅₀ = 0,605 mg/ml

Nilai IC₉₀ di dapat dari persamaan berikut :

$$y = 7,361x^2 + 66,48x + 43,44$$

$$90\% = 7,361x^2 + 66,48x + 43,44$$

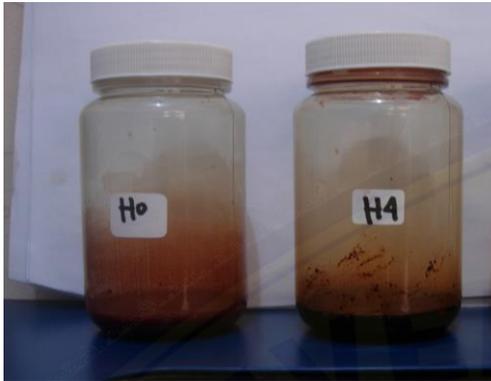
$$0,9 = 7,361x^2 + 66,48x + 43,44$$

$$x^2 - 9,031x - 5,779$$
$$(x + 0,599)(x - 9,64)$$

$$x = 0,599$$
$$x = 9,64$$

$$\mathbf{IC90 = 9,64 \text{ mg/ml}}$$



Lampiran B. Dokumentasi Foto Penelitian

Bubuk polifenol



Larutan uji

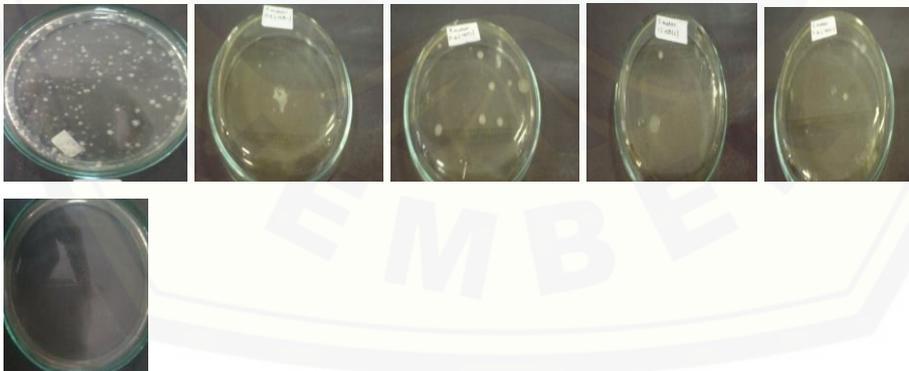


Foto uji penghambatan ekstrak polifenol (H0) terhadap S. Mutans

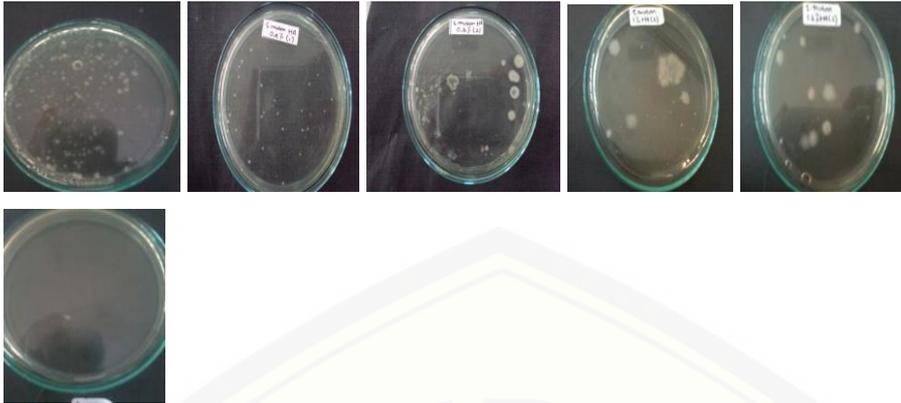


Foto uji penghambatan ekstrak polifenol (H4) terhadap *S. mutans*

