

**LAPORAN AKHIR TAHUN  
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI  
(PDUPT)**



**PEMANFAATAN EKSTRAK KULIT BUAH COKLAT (*Theobroma cacao*)  
SEBAGAI BAHAN IRIGASI INTRAKANAL YANG BIOKOMPATIBEL  
DAN POTENSIAL PADA PERAWATAN SALURAN AKAR**

**TAHUN KE 2 DARI RENCANA 3 TAHUN**

<b>Dr. TAMARA YUANITA, drg., MS., Sp.KG(K)</b>	<b>0025066005</b>
<b>Prof. Dr. SRI KUNARTI, drg., MS., Sp.KG(K)</b>	<b>0028035204</b>
<b>NIRAWATI PRIBADI, drg., MKes., Sp.KG(K)</b>	<b>0015096305</b>

**DIBIYAI OLEH:  
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT  
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN  
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN  
KEPADA MASYARAKAT  
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA  
NOVEMBER 2018**



LAPORAN AKHIR TAHUN  
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI  
(PDUPT)



KKA  
ICE  
LP.47/19  
Yua  
P

PEMANFAATAN EKSTRAK KULIT BUAH COKLAT (*Theobroma cacao*)  
SEBAGAI BAHAN IRIGASI INTRAKANAL YANG BIODKOMPATIBEL  
DAN POTENSIAL PADA PERAWATAN SALURAN AKAR

TAHUN KE 2 DARI RENCANA 3 TAHUN

Dr. TAMARA YUANITA, drg., MS., Sp.KG(K)  
Prof. Dr. SRI KUNARTI, drg., MS., Sp.KG(K)  
NIRAWATI PRIBADI, drg., MKes., Sp.KG(K)

0025066005  
0028035204  
0015096305

DIBIYAI OLEH:  
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT  
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN  
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN  
KEPADA MASYARAKAT  
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018

UNIVERSITAS AIRLANGGA  
NOVEMBER 2018

## HALAMAN PENGESAHAN

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Judul : PEMANFAATAN EKSTRAK KULIT BUAH COKLAT  
(Theobroma cacao) SEBAGAI BAHAN IRIGASI  
INTRAKANAL YANG BIOKOMPATIBEL DAN  
POTENSIAL PADA PERAWATAN SALURANAKAR

**Peneliti/Pelaksana**

Nama Lengkap : Dr. drg TAMARA YUANITA, S.KG, Sp.K.G, M.S  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga  
NIDN : 0025066005  
Jabatan Fungsional : Lektor Kepala  
Program Studi : Kedokteran Gigi  
Nomor HP : 08155130747  
Alamat surel (e-mail) : tamara-y@fkg.unair.ac.id

**Anggota (1)**

Nama Lengkap : Dr. drg SRI KUNARTI S.KG, Sp.K.G, M.S  
NIDN : 0028035204  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

**Anggota (2)**

Nama Lengkap : NIRAWATI PRIBADI S.KG, M.Kes  
NIDN : 0015096305  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

**Institusi Mitra (jika ada)**

Nama Institusi Mitra : -  
Alamat : -  
Penanggung Jawab : -  
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 2 dari rencana 3 tahun  
Biaya Tahun Berjalan : Rp 100,000,000  
Biaya Keseluruhan : Rp 414,000,000



Mengetahui,  
Wakil Dekan III

(Dr. Rini Devijanti Ridwan, drg., M.Kes.)  
NIP/NIK 196412161990022001

Kota Surabaya, 9 - 11 - 2018  
Ketua,

(Dr. drg TAMARA YUANITA, S.KG, Sp.K.G,  
M.S)  
NIP/NIK 196006251986012002

Menyetujui,  
Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi

(Prof. Drs. Hery Purnobasuki, M.Si., Ph.D.)  
NIP/NIK 196705071991021001





## RINGKASAN PENELITIAN

**Latar belakang :** Hampir semua penyakit pulpa dan periapikal disebabkan karena adanya bakteri. Lebih dari 700 spesies bakteri ditemukan pada rongga mulut. Bakteri tersebut masuk ke dalam saluran akar dan jaringan periapikal melewati beberapa jalan antara lain, tubulus dentin, karies, jaringan periodontal atau restorasi yang rusak. Keberhasilan perawatan saluran akar antara lain dipengaruhi oleh *cleaning and shaping*. Tujuannya adalah membuang debris dan bakteri didalam saluranakar secara mekanik dengan alat preparasi serta mengeliminasi bakteri menggunakan bahan irigasi yang berfungsi sebagai antibakteri. Pada pemeriksaan jenis bakteri yang terdapat pada perawatan saluran akar yang mengalami kegagalan ternyata didapatkan bakteri *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) sebagai spesies terbanyak (77–89,6%). *E. faecalis* teridentifikasi sebagai spesies yang mampu bertahan hidup (resisten) saat perawatan saluran akar. Mengingat kemampuan bakteri *E. faecalis* sebagai penyebab kegagalan perawatan saluran akar maka penting dilakukan penelitian untuk mencari bahan alam yang berguna sebagai antioksidan dan biokompatibel. **Indonesia merupakan salah satu produsen coklat/kakao terbesar didunia.** Kulit buah coklat mengandung polifenol dengan kadar 10-12% yang bersifat sebagai antibakteri. Selain itu kandungan fenolnya mempunyai sifat antioksidan yang setara dengan teh hijau. Oleh sebab itu peneliti ingin membuktikan bahwa ekstrak kulit buah coklat (*Theobroma cacao*) dapat dijadikan bahan irigasi intrakanal yang biokompatibel dan potensial pada perawatan saluran akar.

### Tujuan Penelitian:

#### Tahun II:

Untuk membuktikan daya antioksidan dan biokompatibilitas ekstrak kulit buah coklat.

### Urgensi Penelitian:

1. Menurut Riskesdas tahun 2013, penyakit pulpa dan jaringan periodontal merupakan peringkat ke 7 dari 10 pasien terbanyak di rumah sakit di Indonesia sehingga diperlukan suatu perawatan untuk mengatasi masalah tersebut.

2. 77-89,6% kasus kegagalan perawatan saluran akar menunjukkan bahwa bakteri *E. faecalis* dapat bertahan hidup selama dilakukan preparasi khemomekanikal sehingga mengakibatkan re-infeksi karena bersifat resisten terhadap larutan irigasi dan medikamen yang digunakan dalam terapi konservatif

3. Bahan irigasi yang ada dan sering digunakan dalam perawatan saluran akar masih mempunyai efek samping yang tidak menguntungkan yaitu bersifat toksik terhadap jaringan periradikulergigi.

Perlu dikembangkan bahan alami yang bersifat antibakteri, antibiofilm, antiglukan dan antioksidan terhadap mikroorganisma saluran akar gigi dan biokompatibel pada jaringan periapikal untuk meningkatkan keberhasilan perawatan saluran akar.



## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
PRAKATA	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	
DAFTAR GAMBAR	
DAFTAR LAMPIRAN	
BAB 1, PENDAHULUAN	i
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	2
1.4 Manfaat Penelitian	3
2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Proses <i>cleaning</i> pada perawatan saluran akar	4
2.2 Bahan irigasi saluran akar	4
2.3 Bakteri <i>Enterococcus faecalis</i>	5
2.3.1. Faktor Virulensi	5
2.3.2 Faktor Resistensi	5
2.4 <i>Theobroma cacao</i>	6
2.4.1. Klasifikasi	6
2.4.2. Kandungan polifenol	7
2.5. Aktivitas enzim Glucosyltransferase (GTF)	9
2.6. Sifat anti oksidan	9
2.7. Sitotoksisitas	10
3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	13
4. METODE PENELITIAN	13
4.1. Jenis Penelitian	13
4.2. Lokasi Penelitian	13
4.3. Sampel Penelitian	13
4.4. Variabel Penelitian	13
4.5. Definisi Operasional Penelitian	13
4.6. Besar sampel	14
4.7. Alat dan Bahan	14
4.8. Cara Kerja	16
4.8.1 Sterilisasi alat dan bahan	16
4.8.2 Persiapan ekstrak kulit kakao	16
4.8.3 Penelitian antioksidan	17
4.8.4 Penelitian sitotoksisitas	18
5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	19
6. RENCANA DAN TAHAPAN BERIKUTNYA	21
7. KESIMPULAN DAN SARAN	22
DAFTAR PUSTAKA	23
LAMPIRAN	24

## BAB I PENDAHULUAN



### 1.1. Latar Belakang

Mempertahankan gigi selama mungkin di dalam rongga mulut merupakan salah satu tujuan kesehatan gigi khususnya di bidang ilmu Konservasi gigi. *National Health survey* 2010 menunjukkan *Dental and Mouth Disease* menduduki peringkat pertama yaitu sebesar 59,9%. Menurut Riskesdas yang dilakukan oleh Kemenkes pada tahun 2015, penyakit pulpa dan periapikal sebagai peringkat ke 7 dari 10 pasien terbanyak di rumah sakit di Indonesia, sehingga diperlukan suatu perawatan untuk mengatasi masalah tersebut.

Hampir semua penyakit pulpa maupun periradikuler disebabkan oleh keberadaan bakteri. Lebih dari 700 spesies bakteri ditemukan dalam rongga mulut. Bakteri tersebut masuk ke dalam pulpa melalui karies, tubulus dentin, kavitas yang terbuka secara langsung karena trauma, jaringan periodontal dan restorasi yang rusak. Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa hampir 90% bakteri yang ditemukan pada saluran akar yang terinfeksi adalah bakteri anaerob (Ercan *et al.*, 2006).

*Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) merupakan spesies terbanyak yang ditemukan pada perawatan saluran akar yang mengalami kegagalan. Prevalensi *E. faecalis* pada *re-treatment* sebesar 89,6% dan pada infeksi primer sebesar 67,5% (Sedgley, 2006; Fouad, 2009). Kegagalan perawatan saluran akar masih dapat terjadi walaupun telah dilakukan sesuai dengan prosedur. Kegagalan perawatan saluran akar dapat disebabkan karena daya resisten bakteri terhadap terapi konservatif (Bergenholtz *et al.*, 2010).

Mikroorganisme terutama *E. faecalis* memegang peranan penting dalam patogenesis peradangan periapikal gigi (Yuanita, 2012). Adanya bakteri memegang peranan terbesar pada kegagalan perawatan saluran akar. Beberapa bakteri mempunyai faktor virulensi dengan membentuk biofilm dan produknya yang bersifat toksik terhadap jaringan pulpa dan periapikal gigi (Craig, 2004). Bakteri *E. faecalis* dapat membentuk biofilm (Yuanita, 2013), selain itu juga menghasilkan enzim *protease glukosyltransferase* (GTF) yang akan meningkatkan perlekatan mikroorganisma melalui sukrosa yang diubah menjadi polisakarida ekstraseluler/eksopolisakarida (EPS). Perlekatan tersebut akan meningkatkan aderensi permukaan bakteri dengan permukaan *host*. Pada perawatan saluran akar gigi pemberian bahan kimia diharapkan dapat mengganggu perlekatan mikroorganisma terhadap *host*.



Masalah yang dihadapi di bidang kedokteran gigi saat ini adalah hampir semua bahan yang dipakai dalam perawatan gigi merupakan bahan kimia dan memiliki efek samping (Shahani and Reddy, 2011; Kustarci *et al.*,2012). Bahan irigasi saluran akar Sodium hipoklorit dan klorheksidin memiliki sifat toksik yang tinggi. Beberapa laporan kasus menunjukkan berbagai akibat yang ditimbulkan oleh larutan sodium hipoklorit yang ekstrusi ke jaringan periapikal. Penelitian in-vitro yang dilakukan membuktikan bahwa larutan sodium hipoklorit dengan konsentrasi lebih besar dari 0,01% bersifat *lethal* pada sel fibroblas manusia (Chang *et al.*,2001; Ok,2015)..

Penelitian-penelitian di Indonesia saat ini banyak dilakukan untuk mencari bahan-bahan pengganti bahan kimia dengan memakai bahan dasar dari tanaman tradisional ataupun bahan-bahan yang dapat diperoleh dari lingkungan alam yang ada di Indonesia.Indonesia merupakan salah satu produsen kakao terbesar di dunia. Jenis kakao yang mendominasi seluruh perkebunan kakao di Indonesia adalah *Theobroma cacao*.Tahun 2009 produksi biji kakao mencapai 849.875ton pertahun. Buah kakao terdiri dari 75% kulit buah yang merupakan bagian terbesar dari buah kakao. Kulit buah kakao mempunyai komposisi kimia yang cukup kompleks, diantaranya adalah fenol yang bersifat sebagai antimikroba dan antioksidan.

Teh hijau (*Camellia sinensis*) pada penelitian Seng *et al* (2002) diketahui memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. Komponen bioaktif pada bahan herbal memiliki kemampuan antioksidan yang dapat diuji melalui berbagai cara, antara lain menggunakan DPPH dan AAPH.

Penelitian tentang sitotoksitas ekstrak kulit buah coklat (*Theobroma cacao*) terhadap sel *human periodontal ligamen fibroblast* (HPdLF) dan daya antioksidannya masih belum jelas. Berdasarkan beberapa penelitian yang telah ada dan uraian sebelumnya maka peneliti tertarik melakukan penelitian mengenai bahan alam potensial ekstrak kulit buah coklat (*Theobroma cacao*) yang diduga memiliki sifat antioksidan dan biokompatibel sehingga nantinya dapat dimanfaatkan secara luas dalam perawatan saluran akar gigi.

## 1.2. Rumusan masalah

1. Berapa besar perbandingan daya antioksidan antara ekstrak kulit buah coklat (*Theobroma cacao*) dan ekstrak teh hijau (*Camellia sinensis*)?
2. Apakah larutan irigasi ekstrak kulit buah coklat (*Theobroma cacao*) pada konsentrasi tertentu memiliki efek toksik pada sel *human periodontal ligamen fibroblast* (HPdLF) ?

## 1.3. Tujuan penelitian

1. Menentukan besar perbandingan daya antioksidan antara ekstrak kulit buah coklat (*Theobroma cacao*) dan ekstrak teh hijau (*Camellia sinensis*).

2. Menentukan konsentrasi toksik ekstrak kulit buah coklat (*Theobroma cacao*) pada sel *human periodontal ligament fibroblasts* (HPdLF).

#### **1.4. Manfaat penelitian**

Dengan diketemukannya hasil penelitian ini diharapkan bertambahnya bahan irigasi bioproduk dari ekstrak kulit coklat (*Theobroma cacao*) yang bersifat antioksidan dan biokompatibel.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Proses *Cleaning* pada Perawatan Saluran Akar

Infeksi saluran akar dan penyakit periapikal disebabkan oleh bakteri dan produknya. Infeksi saluran akar yang berlangsung lama memungkinkan bakteri masuk ke dalam seluruh sistem saluran akar, termasuk ramifikasi dan tubulus dentin (Cohen, 2011). Terdapat banyak mikroba penyebab infeksi saluran akar, antara lain; *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguis*, *Staphylococcus salivarius*, *Bacillus spp*, *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces odontolyticus*, *Actinomyces meyeri*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, dan masih banyak lagi yang lainnya (Fouad, 2009). Interaksi dan produksi toksin bakteri pada saluran akar dapat menyebabkan terjadinya infeksi saluran akar.

Proses pembersihan selama preparasi kemomekanis dapat menghilangkan iritan seperti bakteri dan produk yang dihasilkannya serta sisa-sisa pulpa dan dentin yang terkontaminasi. Preparasi kimiamekanis ini berperan penting dalam pembersihan saluran akar tetapi tidak mampu menghilangkan mikroorganisme secara menyeluruh dari sistem saluran akar yang kompleks (Ingle *et al.*, 2008). Preparasi kimiamekanis dapat menurunkan jumlah bakteri dalam saluran akar sebesar 50%-70%. Hal ini berarti bahwa masih banyak bakteri tertinggal di dalam saluran akar yang dapat menyebabkan proses infeksi terus berjalan sehingga penyembuhan infeksi pada saluran akar sulit tercapai.

#### 2.2. Bahan Irigasi Saluran Akar

Larutan irigasi saluran akar sebaiknya bersifat antiseptik yaitu dapat merusak dan menghambat metabolisme mikroba juga sekaligus mensterilkan saluran akar. Adapun syarat bahan antiseptik saluran akar adalah mampu membunuh mikroorganisme, mempunyai efektifitas yang cepat, mampu mengadakan penetrasi yang dalam, tetap efektif dengan adanya bahan organik, tidak merubah warna gigi, secara kimia bersifat stabil, tidak berbau dan tidak berasa, ekonomis (Clarkson *et al.*, 2003).

Bahan irigasi yang biasa dipakai adalah yang mempunyai sifat antiseptik artinya suatu bahan yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme secara *in vitro* dan *in vivo* pada jaringan hidup. Efektifitas dan toksisitas larutan ini sangat tergantung pada konsentrasi, suhu dan waktu (Jawetz, 1989).

## 2.3. *Enterococcus faecalis*

### 2.3.1. Faktor Virulensi *Enterococcus faecalis*

Faktor-faktor virulen yang dimiliki *Enterococcus faecalis* menyebabkan bakteri ini memiliki kemampuan untuk membentuk kolonisasi pada *host*, dapat bersaing dengan bakteri lain, resisten terhadap mekanisme pertahanan *host*, menghasilkan perubahan patogen baik secara langsung melalui produksi toksin atau secara tidak langsung melalui rangsangan terhadap mediator inflamasi. Faktor-faktor virulen tersebut adalah komponen *aggregation substance (AS)*, *surface adhesins*, *sex pheromones*, *lipoteichoic acid (LTA)*, *extraceluller superoxide production (ESF)*, *gelatinase lytic enzyme*, *hyaluronidase*, dan *cytolysin*. Faktor-faktor virulensi ini berperan penting dalam patogenesis, sehingga *Enterococcus faecalis* dapat melekat pada sel *hospes* dan matrik ekstraselular, memudahkan invasi ke jaringan, mempunyai efek immunomodulasi, dan menimbulkan kerusakan melalui media toksinnya (Kayaoglu, 2004).

*Enterococcus faecalis* dapat berkolonisasi dalam saluran akar dan bertahan tanpa bantuan dari bakteri lain. Bakteri ini mengkontaminasi saluran akar dan membentuk koloni di permukaan dentin dengan bantuan LTA, sedangkan AS dan *surface adhesin* lainnya berperan pada perlekatan di kolagen. *Cytolysin*, AS-48 dan bacteriosin menghambat pertumbuhan bakteri lain. Hal ini menjelaskan rendahnya jumlah bakteri lain pada infeksi saluran akar yang persisten sehingga *Enterococcus faecalis* menjadi mikroorganisme dominan pada saluran akar (Kayaoglu, 2004).

### 2.3.2. Faktor Resistensi *Enterococcus faecalis*

*Enterococcus faecalis* resisten terhadap banyak antibiotik spektrum luas. Resistensi *Enterococcus faecalis* terhadap antimikroba diperoleh secara intrinsik maupun *acquired* (didapat) melalui transfer gen. Resistensi *acquired* diperoleh dari mutasi DNA atau dapat juga dari gen yang baru melalui transfer plasmid dan transposons.

Selain itu, adanya mekanisme yang mempertahankan level pH *cytoplasmic* tetap optimal menyebabkan bakteri tersebut juga resisten terhadap antimikroba kalsium hidroksida. Seperti diketahui bahwa dalam lingkungan alkali *Enterococcus faecalis* akan menjaga homeostasis melalui pH internal yang berfungsi untuk menjaga agar enzim dan protein berfungsi normal. Prinsip homeostasis terdiri dari dua komponen, yaitu fungsi pasif dan aktif. Fungsi pasif terdiri dari permeabilitas membran yang rendah dan kemampuan buffer sitoplasma. Sedangkan mekanisme aktif melalui kontrol transport kation (kalium, natrium dan proton) melalui membran sel. Pada lingkungan asam sistem antiport kation akan meningkatkan pH internal

dengan keluarnya proton melalui membran sel. Pada keadaan basa kation/proton akan dipompa ke dalam sel agar pH internal lebih rendah. Fungsi pompa proton intraseluler merupakan faktor utama dari resistensi *Enterococcus faecalis* terhadap pH (Estrela and Sydney, 2009).

Saluran akar yang terinfeksi merupakan salah satu kondisi di mana nutrisi kurang memadai, adanya toksin dari bakteri lain dan invasi dari bahan medikamen saluran akar. Kondisi ini dapat menyebabkan perubahan fisiologi spesifik dari *Enterococcus faecalis*. Pada kondisi ini bakteri kehilangan kemampuan untuk tumbuh dan berkembang tetapi tetap hidup dan bersifat patogen. Kondisi inilah yang disebut dengan fase VBNC. Pada kondisi VBNC ini, *Enterococcus faecalis* dapat memaujjang, berbentuk *cocobacillary* dengan permukaan yang tidak rata, terjadi peningkatan produksi *Penicillin Binding Protein* (PBP) yang bila diproduksi dalam jumlah banyak dapat menyebabkan resistensi terhadap penisilin, kuantitas LTA juga menjadi 2 kali lipat lebih tebal sehingga dinding sel lebih kuat dan lebih tahan terhadap kerusakan mekanis. Tidak hanya dapat melakukan fermentasi untuk menghasilkan asam laktik, bakteri ini juga dapat mengkatabolisasi sumber energi dari karbohidrat, gliserol, laktat, malat dan sitrat. Hal ini sangat membantu ketika *Enterococcus faecalis* hidup di daerah yang minim nutrisi seperti saluran akar yang terinfeksi (Luis *et al*, 2004).

Sekarang ini kalsium hidroksida dianggap sebagai obat saluran akar pilihan. Kalsium hidroksida mempunyai kemampuan untuk membunuh kuman. Akan tetapi, hal ini tidak berlaku bagi bakteri *Enterococcus faecalis*. Bakteri ini resisten terhadap kalsium hidroksida. Keadaan ini penting secara klinis, karena pada setiap kegagalan perawatan saluran akar selalu ada kaitannya dengan *Enterococcus faecalis* (Estrela and Sydney, 2009).

## 2.4. *Theobroma cacao*

### 2.4.1. Klasifikasi

Menurut sistematika tanaman coklat berdasarkan klasifikasi secara botani adalah:

Divisi : Spermatophyta

Klas : Dicotyledonae

Ordo : Malvales

Family : Sterculiaceae

Genus : *Theobroma*

Species : *Theobroma cacao* L.

Biji coklat merupakan salah satu komoditi perdagangan yang mempunyai peluang untuk dikembangkan dalam rangka usaha memperbesar/meningkatkan devisa negara serta penghasilan petani coklat. Produksi biji coklat di Indonesia secara signifikan terus meningkat,

namun mutu yang dihasilkan sangat rendah dan beragam, antara lain kurang terfermentasi, tidak cukup kering, ukuran biji tidak seragam, kadar kulit tinggi, keasaman tinggi, cita rasa sangat beragam dan tidak konsisten. Hal tersebut tercermin dari harga biji coklat Indonesia yang relatif rendah dan dikenakan potongan harga dibandingkan harga produk sama dari negara produsen lain (Haryadi dan Supriyanto, 2001).

Buah coklat/kakao pada umumnya terdiri dari 73,63% bagian kulit (pod kakao). Kulit buah kakao adalah bagian mesokarp atau bagian dinding buah kakao, yang mencakup kulit terluar sampai daging buah sebelum kumpulan biji.

#### 2.4.2. Kandungan polifenol

Coklat merupakan sumber makanan kaya senyawa-senyawa bioaktif, terutama polifenol, yang mempunyai khasiat sebagai antioksidan dan antimikroba. Biji coklat mempunyai potensi sebagai bahan antioksidan alami yang mempunyai kemampuan untuk memodulasi sistem imun dan efek kemopreventif untuk pencegahan penyakit jantung koroner dan kanker. Seiring perubahan pola hidup masyarakat dan berkembangnya teknologi, berbagai cara telah dilakukan untuk meningkatkan mutu kualitas produk pangan, salah satunya dengan menggunakan metode pra-perkecambahan yang dapat diterapkan untuk meningkatkan atau memperbaiki nutrisi pada biji coklat (Hiet *al.* 2009)

Kulit buah coklat mempunyai komposisi kimia yang cukup kompleks. Salah satu bahan kimia yang dikandungnya adalah fenol. Fenol merupakan senyawa kimia yang bersifat antimikroba. Senyawa antimikroba adalah senyawa biologis atau kimia yang dapat menghambat pertumbuhan dan aktifitas mikroba. Berdasarkan hal tersebut, kulit buah coklat memiliki potensi untuk dapat dijadikan sebagai salah satu alternatif pengendali dalam menghambat pertumbuhan mikroba patogen pada perawatan saluran akar.

Senyawa antimikroba dapat bersifat bakterisidal (membunuh bakteri), bakteristik (menghambat pertumbuhan bakteri), fungisidal (membunuh jamur), fungistatik (menghambat pertumbuhan jamur) dan lainnya. Beberapa mekanisme senyawa antimikroba dalam menghambat pertumbuhan mikroba adalah sebagai berikut :

Merusak dinding sel sehingga mengakibatkan lisis atau menghambat proses pembentukan dinding sel pada sel yang sedang tumbuh, mengubah permeabilitas membran sitoplasma yang menyebabkan kebocoran nutrient dari dalam sel, misalnya yang disebabkan oleh senyawa fenolik, deterjen sintesis, sabun dan senyawa amonium kuartener, mendenaturasi protein sel dan merusak sistem metabolisme di dalam sel dengan cara menghambat kerja enzim intraseluler.

Beberapa faktor yang mempengaruhi efektifitas antimikroba dalam membunuh mikroorganisme atau menghambat pertumbuhan antara lain adalah .

Konsentrasi zat antimikroba, Jenis, jumlah, umur, dan keadaan mikroorganisme, Suhu, Waktu, Sifat fisik dan kimia seperti pH dan kelembaban.

Penggunaan bahan kimia pada konsentrasi tertentu dapat bersifat fungisidal, atau hanya menghambat pada konsentrasi yang lebih rendah atau bahkan tidak efektif. Beberapa senyawa kimia yang dapat berfungsi sebagai antimikroba adalah alkohol, halogen, logam berat dan senyawanya, zat warna, deterjen, senyawa ammonium kuartemer, asam dan basa, gas khemosterilan dan senyawa fenol. Cara kerja senyawa-senyawa ini memiliki perbedaan tetapi bertujuan untuk menghambat dan membunuh mikroba. Mekanisme kerja senyawa fenolik adalah mendenaturasi protein dan merusak membran sel dengan cara melarutkan lemak yang terdapat pada dinding sel karena senyawa ini mampu melakukan migrasi dan fase cair ke fase lemak.

Senyawa fenol ini dapat membunuh mikroba dengan merusak membran sel. Hal ini berakibat terjadinya kebocoran sel yang ditandai dengan keluarnya makromolekul seperti protein dan asam nukleat dari dalam sel. Kebocoran sel mikroba dapat disebabkan karena rusaknya ikatan hidrolis komponen penyusun membran sel seperti protein dan fosfolipida serta larutnya komponen-komponen yang berikatan secara hidrolis. Hal ini berakibat meningkatnya permeabilitas sel sehingga memungkinkan masuknya senyawa-senyawa fenol dan ion-ion organik ke dalam sel dan keluarnya substansi sel seperti protein dan asam nukleat yang berakibat pada kematian sel. Fenol dapat ditemukan dalam teh, coklat, kopi, apel, dan sebagainya. Kulit buah coklat awalnya berwarna putih, tetapi jika dilukai akan berubah menjadi coklat. Reaksi perubahan warna menjadi coklat sering dijumpai pada buah-buahan yang mengandung substrat senyawa fenolik. Senyawa fenolik akan teroksidasi menjadi senyawa kuinon jika berinteraksi dengan oksigen yang dibantu oleh aktivitas enzim fenol oksidase. Salah satu faktor yang mempengaruhi jumlah kandungan fenol dalam buah adalah tingkat kematangan buah. Tingkat kematangan buah coklat yang berbeda akan mempengaruhi jumlah kandungan fenol yang berbeda pula.

Polifenol mempunyai khasiat sebagai antimikroba dan antioksidan, selain itu kulit buah coklat mengandung flavonoid atau tanin terkondensasi atau terpolimerisasi seperti antosianidin, katekin, leukoantosianidin yang kadang-kadang terikat dengan glukosa. Fenol pada coklat mempunyai sifat antioksidan tiga kali lebih banyak dari teh hijau.

## 2.5. Aktivitas enzim *Glucosyltransferase* (GTF)

Kulit buah coklat mengandung komposisi kimia yang cukup kompleks, antara lain adalah fenol. Fenol merupakan senyawa kimia yang bersifat antimikroba. *Glucosyltransferase* (GTF) adalah suatu enzim yang dihasilkan oleh bakteri yang secara spesifik akan merubah sukrosa menjadi polisakarida ekstraseluler/Eksopolisakarida (EPS). EPS akan memperkuat aderensi permukaan bakteri dengan komponen pelikel gigi. Fimbria yang dimiliki bakteri merupakan faktor penting dalam perlekatan bakteri.

## 2.6. Sifat antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa kimia yang dapat menyumbangkan satu atau lebih elektron kepada radikal bebas sehingga radikal bebas dapat diredam, contohnya antioksidan dapat juga menghambat oksigen reaktif atau nitrogen reaktif (ROS) sehingga dapat mencegah penyakit-penyakit yang dihubungkan dengan radikal bebas.

Perkembangan penelitian di bidang kesehatan modern terutama Biologi Molekuler mengarah kepada radikal bebas dan stress oksidatif yang dapat menginisiasi penyakit kronis dan degeneratif karena mampu mengoksidasi asam nukleat, protein dan lipid dari DNA. Secara kimia, radikal bebas adalah semua atom atau molekul yang memiliki satu atau lebih elektron tak berpasangan pada kulit luarnya yang sangat reaktif dan tidak stabil karena elektron bebas tersebut. Oksigen dibutuhkan makhluk hidup untuk membangkitkan energi (metabolisme) dari ATP yang dihasilkan oleh mitokondria. Kemampuan radikal bebas, oksigen reaktif dan stress oksidatif sebagai mediator injuri jaringan dari berbagai penyakit akibat efek polutan udara seperti ozon, nitrogen dioksida dan asap rokok.

Reaktif Oksigen Spesies (ROS) merupakan hasil dari proses redoks seluler yang memiliki sifat toksik tetapi juga dapat sebagai komponen yang menguntungkan. ROS dalam jumlah kecil hingga sedang dapat berguna dalam respon seluler, tetapi jika terdapat dalam jumlah yang besar, ROS akan mengakibatkan terjadinya stress oksidatif dan dapat menginduksi kematian sel serta memiliki peran penting pada terjadinya infeksi akut dan inflamasi pada jaringan.

Komponen bioaktif pada bahan herbal memiliki kemampuan antioksidan yang teruji secara ilmiah. Komponen antioksidan yang terdapat dalam bahan herbal seperti fenol, polifenol, dan flavonoid menangkap radikal bebas seperti peroksida, hidrogen peroksida, hidroperoksida dan lipid peroksida serta mampu mencegah mekanisme oksidatif yang mengakibatkan penyakit degeneratif (Prakash *et al.*, 2001).



Kulit buah coklat bersifat antioksidan karena mengandung polifenol terutama flavonoid yang sering dibandingkan dengan teh maupun *wine*.

Diduga ada korelasi yang kuat antara besarnya kandungan polifenol dan aktivitas antioksidan dalam kulit buah coklat sehingga peneliti ingin memanfaatkan potensi kulit buah coklat yang berlimpah di Indonesia sebagai larutan irigasi bioproduk yang potensial dan biokompatibel serta bersifat antioksidan pada perawatan saluran akar untuk meningkatkan keberhasilan perawatan. Tidak menutup kemungkinan bahwa ekstrak kulit buah coklat ini dapat dimanfaatkan sebagai bahan bioproduk pada pencegahan maupun sebagai bahan *kavitas cleaner* sebelum gigi ditumpat, sebagai campuran obat kumur maupun pasta gigi pencegah karies.

## 2.7. Sitotoksisitas

Syarat larutan irigasi saluran akar yang ideal adalah memiliki efek antibakteri dengan spektrum yang luas, tingkat toksisitas yang rendah, mampu melarutkan sisa jaringan pulpa nekrotik, mampu mencegah terbentuknya *smear layer* selama preparasi saluran akar atau mampu melarutkannya dengan segera setelah terbentuk (Garg,2014).

Toksikologi dapat didefinisikan sebagai kajian tentang hakikat dan mekanisme efek berbahaya (efek toksis) sebagai bahan kimia terhadap makhluk hidup dan sistem biologis lainnya. Apabila zat kimia dikatakan beracun (toksik) maka kebanyakan diartikan sebagai zat yang berpotensi memberikan efek berbahaya terhadap mekanisme biologis tertentu pada suatu mikroorganisme. Sifat toksik dari suatu senyawa ditentukan oleh dosis, konsentrasi racun di reseptor "tempat kerja", sifat zat tersebut, kondisi bioorganisme atau sistem bioorganisme, paparan terhadap organisme dan bentuk efek yang ditimbulkan. Oleh sebab itu penggunaan istilah toksis atau toksisitas diperlukan identifikasi mengenai mekanisme biologi dimana efek berbahaya tersebut timbul. Sedangkan toksisitas merupakan sifat relatif dari suatu zat kimia dalam kemampuannya menimbulkan efek berbahaya atau penyimpangan mekanisme biologi pada suatu organisme.

Larutan irigasi utama yang sering digunakan adalah sodium hipoklorit, klorheksidin dan EDTA (Fedorowicz,2012; Garg,2014). Penelitian *in vitro* membuktikan bahwa larutan sodium hipoklorit dengan konsentrasi lebih besar dari 0,01 % bersifat lethal pada sel fibroblas manusia. Larutan irigasi klorheksidin juga dilaporkan memiliki efek sitotoksisitas pada sel ligamen periodontal manusia akibat dari kemampuan dalam menghambat sintesis protein (Chang *et al*,2001 ; Ok,2015), sedangkan EDTA juga memiliki sifat toksik tergantung pada konsentrasi

yang digunakan. EDTA dengan konsentrasi 15% dan 17% bersifat toksik pada penelitian *in vitro*.

Sel fibroblas diketahui sebagai sel yang dominan pada jaringan ikat dan berfungsi untuk mensekresi serat kolagen dan substansi ekstra seluler (Junqueira,2007). Sel yang biasa digunakan dalam uji sitotoksitas secara *in vitro* adalah sel fibroblas yang diambil dari gingiva dan ligamen periodontal manusia (Souto Lopez *et al.*,2013). Untuk mendapatkan hasil penelitian yang representatif pada kondisi di dalam rongga mulut manusia maka fibroblas yang digunakan dalam penelitian ini adalah *human primary fibroblast* yang berasal dari ligamen periodontal karena sel tersebut merupakan sel pertama yang berkontak ketika terjadinya eksusi larutan irigasi ke jaringan periradikuler (Rittie *and* Fisher,2005).

### BAB III.

#### TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

Bidang penelitian mengenai kesehatan dan obat merupakan salah satu unggulan di Universitas Airlangga. Bahan herbal sejak lama telah digunakan dalam pengobatan tradisional di seluruh dunia dan secara turun temurun dilestarikan dari generasi ke generasi. Pengobatan tradisional digunakan sekitar 60% dari populasi dunia dan di beberapa negara tergabung dengan sistem kesehatan nasional. Bahan herbal ini dipilih karena mudah didapatkan, hampir tidak memiliki efek samping yang merugikan dan mempunyai toksisitas yang rendah dibanding bahan kimia.

Bahan herbal memiliki kandungan bioaktif umum seperti glikosida, flavonoid, proantosianidin, tannin, terpenoid, resin dan alkaloid yang merupakan metabolit sekunder yang mengeluarkan efek farmakologis dan toksikologis kepada manusia dan hewan. Indonesia memiliki keanekaragaman hayati terbesar kedua setelah Brazil. Terdapat sekitar 7000 tanaman yang diperkirakan memiliki khasiat sebagai obat.

Teknologi modern yang terus berkembang serta penelitian bahan herbal yang semakin meluas dapat mendukung kebijakan pemerintah pada Keputusan Menteri Kesehatan RI Nomor 381 tahun 2007 tentang Kebijakan Obat Tradisional Nasional dalam rangka pemanfaatan sumber daya alam Indonesia untuk meningkatkan pelayanan kesehatan yang teruji secara ilmiah sehingga ketersediaannya dapat digunakan secara luas untuk pelayanan kesehatan formal.

Pada penelitian yang akan dilakukan, peneliti ingin memanfaatkan limbah kulit buah coklat yang memiliki sifat antibakteri, antioksidan dan mempunyai sitotoksitas yang relatif lebih kecil bila dibandingkan bahan kimia yang rutin digunakan pada perawatan saluran akar selama ini.

#### Tujuan penelitian

1. Menentukan besar perbandingan daya antioksidan antara ekstrak kulit buah coklat (*Theobroma cacao*) dan ekstrak teh hijau (*Camellia sinensis*).
2. Menentukan konsentrasi toksik ekstrak kulit buah coklat (*Theobroma cacao*) pada sel *human periodontal ligament fibroblast* (HPdLF).

#### Manfaat penelitian

Dengan diketemukannya hasil penelitian ini diharapkan bertambahnya bahan irigasi bioproduk dari ekstrak kulit coklat (*Theobroma cacao*) yang bersifat antioksidan dan biokompatibel.

## BAB IV METODE PENELITIAN

### 4.1 Jenis Penelitian

Penelitian eksperimental laboratoris *in vitro* dengan rancangan penelitian *post test only control group design*

### 4.2 Lokasi Penelitian

Penelitian Antioksidan dilakukan di Laboratorium Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Widya Mandala Surabaya dan Penelitian Sitotoksitas pada sel *human periodontal ligament fibroblast* (HPdLF) dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gajahmada Jogjakarta.

### 4.3 Sampel Penelitian

Ekstrak kulit buah coklat (*Theobroma cacao*), ekstrak teh hijau (*Camellia sinensis*).

### 4.4 Identifikasi Variabel

#### 4.4.1 Variabel bebas

Ekstrak kulit buah coklat (*Theobroma cacao* varietas *Forastero*)

Ekstrak teh hijau (*Camellia sinensis*)

#### 4.4.2 Variabel terikat

Nilai kapasitas antioksidan berdasarkan intensitas fluoresensi pada Uji Antioksidan dan Persen kematian sel pada Uji Sitotoksitas

#### 4.4.3 Variabel Terkendali

1. Jenis, asal dan cara pembuatan ekstrak kulit buah coklat dan teh hijau.
2. Alat-alat yang digunakan selama penelitian
3. Metode dan cara kerja
4. Cara pembuatan sel kultur primer (HPdLF)
5. Metode pengukuran kematian sel menggunakan ELISA reader pada uji sitotoksitas.
6. Media uji AAPH dan DPPH pada uji antioksidan
7. Cara mengukur kapasitas antioksidan

### 4.5 Definisi Operasional:

a. Ekstrak kulit buah coklat yang digunakan adalah ekstrak kulit buah coklat varietas *Forastero* dari perkebunan di Banyuwangi yang diekstrak dengan pelarut etanol 70% dengan metode ekstraksi maserasi.

b. Sel Human Periodontal Ligament Fibroblast (HPdLF) didapatkan dari pengambilan ligamen periodontal dari sepertiga akar gigi premolar yang diekstraksi untuk perawatan ortodontik, gigi utuh, tidak terdapat tambalan atau karies.

c. Uji sitotoksitas diukur dengan menggunakan MTT assay menggunakan metode enzimatik yang dapat dianalisa secara kuantitatif dengan mengukur *Optical Density* (OD) menggunakan ELISA reader.

d. LC50 merupakan suatu konsentrasi bahan yang dapat menyebabkan kematian sel sebanyak 50% dari jumlah kultur sel Human Periodontal Ligament Fibroblast (HPdLF) yang dapat diestimasi dengan penghitungan pada waktu pengamatan tertentu.

#### 4.6 Besar Sampel

Besar sampel yang memenuhi syarat untuk dianalisa, ditentukan dengan rumus Lameshow (1997) sebagai berikut:

$$n = \frac{2\sigma^2 (Z_{1/2\alpha} + Z_{\beta})^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$$

$$n = \frac{2 \cdot 28,89637^2 (1,96 + 0,84)^2}{(54,75 - 111,5)^2}$$

$$= 4,06$$

#### Keterangan

$n$  – jumlah sampel masing-masing kelompok

$\sigma$  = standart deviasi dari respon kelompok kontrol

$Z_{1/2\alpha}$  = standart deviasi dari  $1/2\alpha = 1,96$

$Z_{\beta}$  = standart deviasi dari  $\beta = 0,84$

$\mu_1$  = rata-rata outcome dari kelompok uji

$\mu_2$  = rata-rata outcome dari kelompok kontrol

#### 4.7 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah .

a. Blender

b. Tabung reaksi dan rak

- c. Mesin sentrifugal
- d. Maserasi
- e. Inkubator
- f. Mikropipet steril
- g. Rotary evaporator
- h. Mikroplate reader
- i. *Microtiter plate / 96-well flat-bottomed plastic tissue culture plate*
- j. Spektrofotometer / ELISA reader
- k. Bioreaktor
- l. Tabung reaksi dan rak
- m. Wellplates 96 well
- n. *Patry* kecil dan besar
- o. Inkubator
- p. Kertas saring
- q. Beaker glass
- r. Mikroskop inverted

**Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :**

- a. Ekstrak kulit buah coklat
- b. Ekstrak teh hijau
- c. *Sel Human Periodontal Ligament Fibroblast*
- d. Trypsin
- e. EDTA
- f. *Phosphate-buffered saline (pH 7,3)*
- g. DMEM
- h. FetalBovine Serum 5%
- i. Fungizone 100 µg/ml
- j. Penicillin 100 µg/ml
- k. Streptomycin 100 µg/ml
- l. MTT
- m. *Stopper solution*

## 4.8 Cara Kerja

### 4.8.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini disterilkan dalam *autoclave*. Sterilisasi dalam *autoclave* dengan suhu 121°C selama 30 menit.

### 4.8.2 Persiapan ekstrak kulit kakao:

Ekstrak kulit coklat dibuat dari kulit coklat segar 1000 gram yang ditumbuk hingga kecil, disaring dengan ayakan, dimaserasi dengan etanol dalam tabung *erlenmeyer* dan ditutup dengan *aluminium foil* selama 3x24 jam. Ekstrak kemudian disaring dengan corong *Buchner*. Hasil saringan didapatkan ekstrak cair yang kemudian diuapkan sampai bebas dari pelarut etanol dengan menggunakan *Rotary Vacuum Evaporator* pada suhu 40° Celcius sampai didapatkan ekstrak murni.

## 1. Penelitian tentang Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DDPH seperti yang dilakukan oleh Othman *et al* (2007) yaitu : dibuat larutan uji dengan konsentrasi 5 mg/ml, 2,5 mg/ml, 1,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,1 mg/ml dan 0,01 mg/ml dalam etanol absolut. Sebanyak 100 ml larutan uji ditambahkan 1 ml larutan DPPH 0,4 nM dan 5 ml etanol. Campuran selanjutnya divortex dan dibiarkan selama 30 menit. Larutan kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 uM. Dilakukan juga pengukuran absorbansi blanko. Hasil penetapan antioksidan dibandingkan dengan ekstrak teh hijau dan vitamin C.

## 2. Penelitian tentang Sitotoksitas

### Pembuatan Kultur sel primer

- a. Gigi premolar yang sudah dicabut dimasukkan ke dalam tabung 10 ml berisi medium DMEM yang telah ditambahkan *fungizone* 100µg/ml, *penicillin* 100 µg dan *streptomycin* 100 µg/ml.
- b. Gigi kemudian dikeluarkan dari tabung dan dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali, dan diletakkan pada *patry* yang berisi medium DMEM/ PBS.
- c. Gigi yang telah dicabut kemudian discalpel di bagian 1/3 apikal lalu diletakkan pada *patry* kecil dan ditutup dengan *deck glass* steril kemudian ditambahkan medium lengkap 3 ml DNEM 10% lalu dimasukkan ke dalam *patry* besar kemudian diinkubasi pada inkubator CO2 5%.
- d. Setiap 4 hari medium dalam *patry* dibuang dan diganti baru.
- e. Sel diamati sampai terlihat 80% konfluent kemudian jaringan periodontal dibuang dan medium dicuci PBS

f. Medium kemudian ditambahkan 1 ml trypsin/EDTA.

g. Apabila sel terlihat telah terlepas, medium disempit dengan pipet dan dimasukkan tabung sebanyak 5 ml.

h. Dilakukan *centrifuge* selama 5 menit dengan kecepatan 1200 rpm kemudian supernatan dibuang, kemudian ditambahkan medium lengkap DMEM 10% sebanyak 1 ml, dicampur/dihomogenkan kemudian dimasukkan dalam beberapa *flash* dan diinkubasi di inkubator CO<sub>2</sub> 5%. Setiap 4 hari medium dibuang dan diganti dengan medium yang baru.

i. Lakukan pengamatan di bawah mikroskop, apabila sel sudah terlihat 80% konfluent dilakukan penghitungan sel kemudian sel dibagi dalam *plate 96 well* dan sel siap dilakukan *treatment*.

### Tahap Treatment Sel

a. Transfer sel ke dalam sumuran/*plate 96well* masing-masing sebanyak 100µl suspensi sel dengan kepadatan  $5 \times 10^4$  /50.000 sel/*well*, kemudian diamkan selama 1-2 jam. Disisakan 3 sumuran tanpa diisi sel untuk kontrol media.

b. Inkubasi sel di dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% selama minimal 4 jam agar sel *attach* kembali setelah panen.

c. Setelah 24 jam dilakukan pengamatan di bawah mikroskop dan difoto, ambil *plate* pada inkubator kemudian buang media sel (*plate* dibalik 180°) di atas tempat buangan dengan jarak 10 cm kemudian tekan *plate* secara perlahan di atas tisu untuk meniriskan sisa cairan.

d. Tambahkan 100 µl PBS ke dalam seluruh sumuran yang terisi sel, kemudian buang PBS dengan cara membalik *plate* di atas tisu.

e. Setelah itu ditambahkan 100 µl ekstrak dengan berbagai konsentrasi.

f. Inkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> selama 24 jam (kadar CO<sub>2</sub> 5%, suhu 37°C, kelembaban 98%).

g. Setelah 24 jam dilakukan pengamatan di bawah mikroskop dan difoto.

h. Media sel dibuang kemudian dicuci dengan PBS lalu PBS dibuang

i. Ditambahkan 100 µl MTT (5 mg MTT + 1 ml PBS + 9 ml medium DMEM komplet/ medium penumbuh pada masing-masing *well*, diinkubasi selama 4 jam hingga formasi terbentuk.

j. Ditambahkan *stopper solution* 100 µl SDS 10% dalam 0,01 NHCL pada masing-masing *well* dan diinkubasi *overnight*.

k. Kemudian dihitung dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 550 nm. Sel fibroblast yang hidup akan terwarnai dengan formazan menjadi biru, sedangkan yang mati tidak terbentuk warna biru.

i. Dilakukan penghitungan kematian sel dengan rumus



**OD Kontrol – OD Sampel**

$$\% \text{ Kematian sel} = \frac{\text{OD Kontrol} - \text{OD Sampel}}{\text{OD Kontrol}} \times 100\%$$

Keterangan : OD = Optical Density

**4.9 Analisis Data**

Pengolahan data menggunakan analisis statistik :

- a. Uji normalitas menggunakan tes *Kolmogorof-Smirnoff*
- b. Uji homogenitas varians menggunakan tes *Levene*
- c. Uji parameter menggunakan *One Way Anova*

Analisis probit untuk memperoleh harga  $LC_{50}$

## BAB V

### HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

#### I. Telah menyelesaikan penelitian Sitotoksitas.

##### Hasil Penelitian Sitotoksitas

Pengujian sitotoksitas ekstrak kulit buah coklat (*Theobroma cacao*) pada sel *human periodontal ligamen fibroblast* dilakukan dengan metode MTT *assay* dan pembacaan hasil dengan menggunakan *Elisa reader* pada panjang gelombang 550 nm.

Terdapat 10 kelompok penelitian yaitu ekstrak kulit buah coklat dengan konsentrasi 3000 µg/ml; 1500 µg/ml; 750 µg/ml; 375 µg/ml; 187,5 µg/ml; 93,75 µg/ml; 46,875 µg/ml; 23,4375 µg/ml; 11,71875 µg/ml; 5,85 µg/ml, dimana tiap kelompok perlakuan dilakukan 3 replikasi.

Hasil pengujian pada tiap kelompok perlakuan adalah sebagai berikut :

**Tabel Hasil optical density ekstrak kulit buah coklat dan kematian sel**

Konsentrasi	Rata-rata Optical density	Rata-rata % kematian sel	Standart deviasi Optical Density
3000 µg/ml	0,248	75,684	0,043
1500 µg/ml	0,386	62,255	0,01
750 µg/ml	0,51	50,130	0,006
375 µg/ml	0,578	43,415	0,009
187,5 µg/ml	0,589	43,372	0,008
93,75 µg/ml	0,598	41,460	0,021
46,875 µg/ml	0,622	39,113	0,007
23,4375 µg/ml	0,720	29,530	0,025
11,7187 µg/ml	0,743	27,346	0,02
5,8593 µg/ml	0,834	18,415	0,026
Kontrol	1.022	-	-

MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
S R B A Y A

## II. Telah menyelesaikan penelitian Antioksidan

### Hasil Penelitian Antioksidan

Uji antioksidan dilakukan dengan metode DPPH pada enam konsentrasi yaitu 5 mg/ml; 2,5 mg/ml; 1,25 mg/ml; 0,5 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,01 mg/ml yang diukur dengan panjang gelombang 517  $\mu$ m, dilakukan pengukuran absorbansi blanko. Hasil penetapan antioksidan dibandingkan dengan teh hijau dan Rutin.

Kelompok	Rerata	Standart deviasi
Rutin	60,158	2,414
Teh hijau	56,361	1,293
Kulit buah coklat	44,613	1,471
Kombinasi	47,89	1,326

III. Sebagai pemakalah Seminar Internasional pada JSMID (Joint Scientific Meeting in Dentistry) ke V 2-3 Oki di Surabaya,

## BAB VI

### RENCANA DAN TAHAPAN BERIKUTNYA

Pada tahun ke III, direncanakan akan melakukan penelitian tentang :

1. Konsentrasi daya hambat ekstrak kulit buah coklat (*Theobroma cacao*) terhadap pembentukan *Extracellular Polymeric Substance* (EPS) Biofilm *Enterococcus faecalis*
2. Perbedaan Kebersihan permukaan dinding saluran akar setelah diirigasi menggunakan larutan ekstrak kulit buah coklat dan propolis,



## **BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN**

### **KESIMPULAN**

Ekstrak kulit buah coklat mempunyai sitotoksisitas yang lebih rendah dibandingkan NaOCL dan Chlorhexidine dan daya antioksidan yang hampir setara dengan teh hijau.

### **SARAN**

Perlu dilakukan penelitian untuk membuktikan kebersihan saluran akar setelah dilakukan irigasi menggunakan ekstrak kulit buah coklat.



**DAFTAR PUSTAKA**

- Bergenholtz G, Preben HB, Reit C. 2010. Apical Periodontitis in Textbook of Endodontology. 2<sup>nd</sup> ed. UK. Blackwell Publ Ltd. P 113-127.
- Baharum Z, Akim A, Hin TY, Hamid RA, Kasran R. 2016. Theobroma cacao: Review of the Extraction, Isolation and Bioassay of it's Anti-Cancer Compounds, Trop.Life Sci Res J.27 (1) :: 21-42.
- BerkittenM, Okar I, Berkitten R. 2006. In vitro of penetration of Sanguish and Prevotella intermedia strain into human dentinal tubulus. J Endod. 26 :236-239.
- Clarkson RM, Padlich HM, Savage NW, Moule AJ. 2003. A survey of hypochlorite use by general dental practitioners and endodontist in Australia. Aust Dent J. 48 (1) : 20-26.
- Cohen S, Hargreaves KM. 2011. Cohen's Pathways of the Pulp. 10 th ed, St Louis Missouri. Mosby Inc. p 529-558.
- Craig B. 2004. Microbiologic Aspects of Endodontic Infections. CDA J. 32 : 6-11.
- Cwikla S, Bellanger M, Giguere S, Ffox A, Verticci F. 2000. Dentinal tubulus disinfection using three calcium hydroxide formulation. J Endod. 31 :50-52.
- Ercan E, Dalli M, Yafuz I, Ozekinci I. 2006. Investigation of microorganisms in infected dental root canals. Biotechnol and Biotechnol eq. 2 :166-172.
- Estrella C, Pimenta FC, Ito IY, Bamman LL. 1999. Antimicrobial evaluation of calcium hydroxide in infected dentinal tubulus. J Endod. 25 :416-418
- Ferreira FB, Vale MS, Granjeirob JM. 2003. Evaluation of pH levels and calcium ion release in various calcium hydroxide endodontic dressing. Oral Surg, O Med Oral Pathol. 97:388-392.
- Fouad AF. 2009. Endodontic Microbiology, 1<sup>st</sup> ed. Wiley-Blackwell, Baltimore USA. P 95-149.
- Hii CL, Law CL, Suzannah S, Misnawi M. 2009. Polyphenols in cocoa. As J Food Ag. 2 (4) : 702-722.
- Ingle JI, Bakland LK and Baumgartner JC. 2008. Endodontic 6<sup>th</sup> ed. Shelton USA, Mc Graw-Hill..p 221-308, 494-519.
- Jawetz E. 2002. Desinfectans and Antiseptics. Basic and Clinical Pharmacology, 26 th ed. Connecticut. Appleton & Lange, pp. 612-615.
- Kayaoglu G, Orstavik D. 2004, Virulence factors of *Enterococcus faecalis* : Relationship of Endodontic disease. Crit Rev Oral Biol Med. 15 (5) : 308-320.
- Kundabala M. Suchitra U. 2002. *Enterococcus faecalis* : An endodontic pathogen. J Endod. 33 :11-13.
- Luis M, Marie T, Pezzlo E. 2004. Color Atlas of Medical Bacteriology. Washington DC. American Society for Microbiology Press.
- Othman A, Ismail A, Ghani NA, Adenan I. 2007. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa bean. Food Chemistry. 100. 1523-1530.
- Peciuliene V, Balciuniene L, Ericson HM, Haapsalo M. 2000. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root filled canals in Lithuanian population. J Endod. 26 : 593-595
- Podbielski A, Sphars A, Haller B. 2003. Additive microbial activity of calcium hydroxide and chlorhexidine on common endodontic bacterial pathogens. J Endod. 29 : 340-345.
- Rusconi M, Conti A. 2010. Theobroma Cacao L. The foods of the God : A scientific approach. Pharm Res. 61 :5-13.
- Schafer E and Bossman K. 2004. Antimicrobial Efficacy of Chlorhexidine and Two Calcium Hydroxide Formulation against *Enterococcus faecalis*. J Endod. 31 :53-56.
- Sedgley CM, Duggan JM. 2007. Biofilm formation of Oral and Endodontic *Enterococcus faecalis*. JOE. 33 (5): 815-818.
- Yuanita T. 2012. Mekanisme imunopatobiologi resorpsi tulang periapikal gigi pada periodontitis apikal kronis akibat infeksi bakteri *Enterococcus faecalis*. Disertasi Universitas Airlangga..
- Yuanita T, 2013. Minimum bacterial concentration of East Java propolis extract to biofilm of *Enterococcus faecalis*. E Journal APIMONDIA, Kiev, Ukraina.

## LAMPIRAN

Research Report

**UJI SITOTOKSISITAS EKSTRAK KULIT BUAH COKLAT (*Theobroma Cacao. L*)  
 PADA SEL *HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT FIBROBLAST (HPdLF)***

**Tamara Yuanita, Sri Kunarti, Nirawati Pribadi, Amanda Diah Prameswari, Ari Subiyanto**

Departement of Conservative Dentistry  
 Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga  
 Surabaya-Indonesia

**ABSTRACT**

**Background:**One of ideal requirement for an irrigant is have low toxicity level, because it have possibilty extrusion to apical. Ligament periodontal cells are the major cells when exposed by endodontic material and fibroblast cell is the first line cell reacted when irrigation solution extruded to periradicular. Cacao pod extract is known have anti oxidant, anti bacterial, and anti inflammation ability so that can be used as alternative become irrigation solution. Every new material must be tested its biocompability before used.

**Purpose:**Analyzed toxicity of cacao pod extract (*Theobroma Cacao L.*)onHuman Periodontal Ligament Fibroblast (HPdLF) Cells **Methods:** Primary cell culture taken from extracted premolar for orthodontic treatment reason, then cells exposed with different concentration of cacao pod extract and tested it toxicity with MTT Assay, followed by ELISA Reader. **Result:**Cacao pod extract at  $\geq 750 \mu\text{g/ml}$  cause the death of  $> 50\%$  cells.**Conclusion:** Cacao pod extract concentration at  $\geq 750 \mu\text{g/ml}$  can't be used as an endodontic irrigant solution because it is toxic.

**Keywords:** Cytotoxicity, Human Periodontal Ligament Fibroblast Cells,Cacao Pod (*Theobroma Cacao. L*) Extract,  $LC_{50}$

**Kata Kunci :***Sitotoksisitas, Sel fibroblas ligamen periodontal manusia, Ekstrak kulit buah coklat,  $LC_{50}$*

**Correspondence :**Tamara Yuanita, c/o : Departemen Ilmu Konservasi Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga. Jl. Prof. Dr. Moestopo No.47, Surabaya, Jawa Timur 60132. E-mail :tamara-y@fkg.unair.ac.id, Telp/Hp : (+62)8155130747.

## PENDAHULUAN

Endodontik merupakan bagian dari ilmu Kedokteran Gigi yang menyangkut diagnosis serta perawatan penyakit pada jaringan pulpa dan jaringan periapikal. Perawatan saluran akar atau perawatan endodontik memiliki prinsip perawatan yang dikenal sebagai *Triad Endodontic*. Prinsip-prinsip tersebut adalah *cleaning and shaping*, sterilisasi, dan obturasi (Garg, 2014). Pada tahapan preparasi atau *cleaning and shaping* merupakan kombinasi antara instrumentasi mekanik dan irigasi dengan bahan antibakterial sehingga disebut sebagai preparasi kemomekanikal. Tujuan utama dari preparasi kemomekanikal adalah mengeliminasi mikroorganisme di dalam saluran akar, membuang jaringan pulpa yang dapat menyebabkan pertumbuhan mikroba, dan mencegah terdorongnya debris ke foramen apikal yang dapat menyebabkan inflamasi (Plotino *et al*, 2016).

Syarat larutan irigasi saluran akar yang ideal adalah memiliki efek tingkat toksisitas yang rendah, antibakteri dengan spektrum yang luas, mampu melarutkan sisa jaringan pulpa nekrotik, mencegah terbentuknya *smearlayer* selama preparasi saluran akar atau mampu melarutkannya segera setelah terbentuk (Garg, 2014). Larutan irigasi utama yang sering digunakan adalah *sodium hypochlorite*, *chlorhexidine*, dan EDTA. Disamping efektivitas yang dimiliki oleh larutan-larutan irigasi tersebut, sifat toksisitas yang dimiliki cukup tinggi ketika ekstrusi ke jaringan periapikal. Ekstrusi larutan irigasi dapat terjadi ketika terjadi *over-instrumentation* serta penggunaan jarum irigasi saluran akar di dalam saluran akar yang disertai tekanan berlebihan saat perawatan saluran akar (Silva *et al*, 2016). Keadaan gigi dengan apikal terbuka, adanya resorpsi eksternal, dan perforasi pada dinding kavitas juga dapat menyebabkan ekstrusi larutan irigasi ke jaringan periradikuler (Kim *et al*, 2015).

Penelitian *In Vitro* yang dilakukan oleh Mooduto *et al* tahun 2017 ditemukan bahwa konsentrasi sodium hipoklorit 0,25 µl/ml dapat membunuh 52,17% sel *Human Periodontal Ligament Periodontal Fibroblast*. Didukung pula oleh penelitian yang dilakukan Ristyawati tahun 2017 mengenai uji toksisitas larutan irigasi NaOCL terhadap sel *Human Periodontal Ligament Periodontal Fibroblast* bahwa konsentrasi yang dapat mematikan 50% sel tersebut sebesar 0,254 µl/ml. Larutan irigasi *chlorhexidine* juga dilaporkan memiliki efek toksisitas pada sel fibroblast ligamen periodontal manusia akibat dari kemampuan dalam menghambat sintesis protein (Ok *et al*, 2015). Penelitian mengenai uji sitotoksitas Qmix (kombinasi antara EDTA 17% dan CHX 2%) terhadap sel fibroblast ligamen periodontal manusia yang dilakukan Oleh Elizabeth tahun 2017 menunjukkan bahwa konsentrasi yang dapat mematikan 50% sel tersebut sebesar 0,363 µl/ml. karena adanya kelemahan dari larutan irigasi tersebut seperti adanya efek toksik pada jaringan sehat, maka saat ini mulai dikembangkan bahan alami yang memiliki efektifitas yang hampir sama tetapi memiliki sifat toksisitas yang rendah.

Salah satu bahan alami yang dapat digunakan sebagai alternatif larutan irigasi saluran akar adalah ekstrak kulit buah coklat karena memiliki sifat anti oksidan, anti bakteri, dan anti inflamasi. Kulit buah coklat merupakan bagian terbesar dari buah coklat (75,52 % dari buah coklat segar). Setiap tahun produksi biji coklat meningkat, ini mengakibatkan semakin meningkatnya kulit buah coklat yang terbuang (Pusat Penelitian Kopi dan Kakao, 2010). Kulit buah coklat berpotensi memiliki sifat antibakteri alami karena mengandung senyawa polifenol. Menurut penelitian Azizah *et al* pada tahun 2016 mengenai penapisan fitokomia menunjukkan adanya golongan senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, polifenol, saponin, kuinon, dan seskuiterpenoid pada kulit buah coklat.



Ekstrak kulit buah coklat diketahui dapat menghambat pembentukan biofilm bakteri *E. Faecalis* dengan nilai *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) sebesar 3,12% (Putri, 2017). Penelitian yang dilakukan oleh Andari tahun 2018 mengenai kebersihan saluran akar menggunakan larutan irigasi ekstrak kulit buah coklat bersifat efektif pada konsentrasi 6,25%. Karena adanya pernyataan diatas, peneliti tertarik melakukan penelitian dengan menggunakan ekstrak kulit buah coklat sebagai alternatif bahan baru larutan irigasi saluran akar.

Setiap bahan baru hasil uji penelitian yang telah dilakukan secara *in vivo* pada hewan coba maupun pada media kultur bakteri harus melalui uji biokompatibilitas terlebih dahulu sebelum diaplikasikan efektivitasnya padamanusia dan dijadikan sebuah produk paten. Biokompatibilitas secara umum ditentukan dengan uji-uji yang menggunakan prinsip toksikologi yang menyediakan informasi tentang potensi toksisitas material pada aplikasi klinis (Basu, B. 2017). Untuk menyelidiki biokompatibilitas suatu material, dilakukan uji sitotoksitas yang penelitiannya dilakukan melalui uji *in vitro* menggunakan kultur sel. Indikator pengujian untuk menentukan toksisitas pada sel kultur adalah  $LC_{50}$  (*Lethal Concentration*).  $LC_{50}$  merupakan suatu konsentrasi bahan yang dapat membunuh 50% dari jumlah kultur sel (Zhang, *et al.* 2007).

Sel fibroblas diketahui sebagai sel yang dominan terdapat di jaringan ikat dan berfungsi mensekresi serat kolagen dan substansi ekstraseluler. Sel yang biasa digunakan dalam uji sitotoksik *in vitro* adalah sel fibroblas yang diambil dari gingiva dan ligamen periodontal manusia (Souto Lopes *et al.*, 2013). Untuk mendapatkan hasil penelitian yang representatif terhadap kondisi rongga mulut manusia maka fibroblas yang digunakan dalam penelitian ini adalah *human primary fibroblast* yang berasal

dari ligamen periodontal karena sel tersebut merupakan sel pertama yang berkontak ketika terjadinya ekstrusi larutan irigasi ke jaringan periradikuler (Ok *et al.*, 2016).

## METODE PENELITIAN

Sebelum melakukan penelitian telah diperoleh persetujuan dari tim etik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga dengan nomor sertifikat 197/HRECC.FODM/IX/2017.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit buah coklat yang dibuat di Fakultas Farmasi Universitas Widya Mandala. Buah coklat segar berjenis *Forastero* yang berasal dari kota Banyuwangi diekstrak dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% hingga diperoleh ekstrak kental. Kemudian ekstrak kental tersebut diencerkan dengan larutan FBS 5% hingga diperoleh konsentrasi 3000; 1500; 750; 375; 187,5; 93,75; 46,875; 23,4375; 11,7187; 5,8593 ( $\mu\text{g/ml}$ ).

Pembuatan sel *Human Periodontal Ligament Fibroblast* (HPdLF) didapatkan dari pengambilan ligamen periodontal 1/3 akar gigi premolar yang diekstraksi untuk perawatan ortodontik. Pembuatan kultur sel dilakukan di LPPT (Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu) Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.

Gigi premolar yang sudah dicabut dimasukkan ke dalam tabung 10 ml berisi medium DMEM yang telah ditambahkan *fungizone* 100  $\mu\text{g/ml}$ , *penicillin* 100  $\mu\text{g/ml}$ , dan *streptomycin* 100  $\mu\text{g/ml}$ . kemudian ligament periodontal diambil dengan cara discalpel bagian 1/3 apikal, lalu diletakkan pada *patry* kecil dan ditutup dengan *deck glass* steril kemudian ditambahkan medium lengkap 3 ml DMEM 10% dan diinkubasi pada inkubator  $\text{CO}_2$  5%. Setiap 4 hari sekali media komplit diganti hingga sel terlihat 80% konfluent. Kemudian dilanjutkan tahap pembuatan kultur sekunder.

Sel yang telah terlihat 80% konfluent, kemudian dilakukan perhitungan sel, dan sel dibagi dalam plate

96 well. masing-masing sebanyak 100 µl suspensi sel dengan kepadatan  $2 \times 10^4$  / 20.000 sel/ well, kemudian diamkan selama 1-2 jam. Disisakan 3 sumuran tanpa diisi sel untuk kontrol media. Setelah itu ditambahkan 100 µl ekstrak kulit buah coklat dengan berbagai konsentrasi dan diinkubasi di dalam inkubator CO<sub>2</sub> selama minimal 24 jam (kadar CO<sub>2</sub> 5%, suhu 37<sup>o</sup>, kelembapan 98%) agar sel *attach* kembali setelah panen. Setelah 24 jam dilakukan pengamatan dibawah mikroskop dan difoto. Tambahkan 100 µl PBS kedalam seluruh sumuran yang terisi sel, kemudian buang PBS dengan cara membalik plate diatas tisu. Kemudian ditambahkan 100 µl MTT (5 mg MTT + 1 ml PBS + 9 ml medium DMEM komplet / medium penumbun) pada masing-masing well. diinkubasi selama 4 jam hingga formazan terbentuk.

Ditambahkan *stopper solution* 100 µl SDS 10% dalam 0,01 N HCl pada masing-masing well, dan diinkubasi *over night*. Kemudian dihitung dengan *ELISA Reader* pada panjang gelombang 550 nm. Sel fibroblast yang hidup akan terwarnai dengan formazan menjadi biru, sedangkan yang mati tidak terbentuk warna biru. Dilakukan perhitungan kematian sel dengan rumus Meyer (1982) :

$$\% \text{ Kematian sel} = \frac{\text{OD Kontrol} - \text{OD Sampel}}{\text{OD Kontrol}} \times 100\%$$

Keterangan : OD = *Optical Density*

Setelah didapatkan hasil penelitian, dilakukan analisa data hasil uji toksisitas ekstrak kulit buah coklat (*theobroma cacao. L*) pada sel *human periodontal ligament fibroblast* (HPdLF). Analisis data yang pertama kali dilakukan adalah mencari normalitas data dengan *Kolmogorov-Smirnov Test*. Selanjutnya dilakukan uji homogenitas dengan *Levene Test*. Berdasarkan hasil analisa data diatas didapatkan data dengan distribusi normal dan homogen, sehingga uji statistik berikutnya menggunakan uji parametri. Uji

parametri yang akan digunakan adalah uji *One Way ANNOVA* dan dilanjutkan dengan uji *Tukey HSD* untuk mengetahui perbedaan diantara kelompok percobaan.

## HASIL

Berdasarkan hasil pengujian pada 11 kelompok perlakuan, didapatkan hasil yang tercantum pada tabel 1.

Tabel 1. : Hasil *optical density* ekstrak kulit buah coklat dan persentase kematian sel.

No	Konsentrasi	Rata-Rata <i>Optical Density</i>	Rata-Rata % Kematian Sel
1	3000 µg/ml	0,248	75,684
2	1500 µg/ml	0,386	62,255
3	750 µg/ml	0,51	50,130
4	375 µg/ml	0,578	43,415
5	187,5 µg/ml	0,589	42,372
6	93,75 µg/ml	0,598	41,460
7	46,875 µg/ml	0,622	39,113
8	23,4375 µg/ml	0,720	29,530
9	11,7187 µg/ml	0,743	27,346
10	5,8593 µg/ml	0,834	18,415
11	Kontrol	1,022	-

Berdasarkan tabel diatas, semakin tinggi konsentrasi maka nilai *optical density* semakin rendah. *Optical density* yang semakin rendah menunjukkan kematian sel yang semakin tinggi. Hal ini menunjukkan semakin tinggi konsentrasi, maka semakin tinggi nilai toksisitasnya. Terlihat pula konsentrasi ekstrak kulit buah coklat yang dapat menyebabkan kematian sel fibroblas ligamen periodontal manusia sebesar >50% (LC<sub>50</sub>) yaitu 750 µg/ml. Dapat diartikan bahwa konsentrasi  $\geq 750$  µg/ml merupakan konsentrasi toksik.

Tabel 2 : Hasil Uji Signifikansi *Tukey HSD*

Group ( $\mu\text{g/ml}$ )	N	Subset for alpha = .05						
		1	2	3	4	5	6	7
3000	4	.24850						
1500	4		.38600					
750	4			.51000				
375	4				.57850			
187.5	4				.59850			
93.75	4				.58925			
46.875	4				.62250			
23.4375	4					.72050		
11.7187	4					.74300		
5.8593	4						.83425	
Sig.		1.000	1.000	1.000	.142	.883	1.000	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.  
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

Hasil uji *Tukey HSD* menunjukkan ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan antara kelompok percobaan. Perbedaan signifikan ditunjukkan apabila setiap nilai *meandari* setiap konsentrasi ada pada kolom subset yang berbeda.

Hasil pada tabel 2 diatas menunjukkan bahwa antara konsentrasi 375  $\mu\text{g/ml}$ ; 93,75 $\mu\text{g/ml}$ ; 187,5  $\mu\text{g/ml}$ ; 46,875  $\mu\text{g/ml}$  dan antara konsentrasi 23,4375 $\mu\text{g/ml}$ ; 11,7187  $\mu\text{g/ml}$  tidak memiliki perbedaan yang signifikan (nilai means berada pada kolom subset yang sama). Namun konsentrasi 750  $\mu\text{g/ml}$  memiliki perbedaan yang signifikan dengan konsentrasi 3000  $\mu\text{g/ml}$ , 1500  $\mu\text{g/ml}$ ; dan konsentrasi lain dibawahnya (nilai means berada pada kolom subset yang berbeda). Sehingga perbedaan signifikan yang dimiliki konsentrasi 750  $\mu\text{g/ml}$  tersebut, dapat disimpulkan bahwa nilai  $LC_{50}$  ekstrak kulit buah coklat berada pada konsentrasi tersebut.

## PEMBAHASAN

Setiap interaksi suatu bahan dengan sel biologi akan menimbulkan efek. Salah satu tujuan dari uji toksisitas adalah menentukan atau mendeteksi kapan efek toksik tersebut muncul yang bergantung pada dosis, potensi intrinsik dari toksikan, dan juga oleh lama kontak xenobiotika dengan organisme "sistem biologik" (Arome dan Chinedu, 2013). Pada penelitian ini, dilakukan uji sitotoksitas ekstrak kulit buah coklat (*Theobroma Cacao.L*) pada sel *Human Periodontal*

*Ligament Fibroblast* (HPdLF). Penelitian ini bertujuan untuk menentukan toksisitas bahan pada sel kultur. Pengujian yang digunakan adalah menentukan nilai  $LC_{50}$  (*Lethal Concentration*).  $LC_{50}$  merupakan suatu konsentrasi bahan yang dapat membunuh 50% dari jumlah kultur sel sehingga dapat diketahui konsentrasi minimal yang aman jika ekstrak kulit buah coklat digunakan sebagai bahan larutan irigasi saluran akar.

Sel fibroblas diketahui sebagai sel yang dominan terdapat di jaringan ikat dan berfungsi mensekresi serat kolagen dan substansi ekstraseluler (Mescher, 2016). Menurut Souto, *et al* tahun 2013, sel yang sering digunakan dalam uji sitotoksik *in vitro* adalah sel fibroblas yang diambil dari gingiva dan ligamen periodontal manusia. Selain itu, sel-sel pada ligamen periodontal merupakan sel utama yang berperan saat terjadinya reaksi pada jaringan periapikal akibat bahan-bahan endodontik dan sel fibroblas sendiri menjadi sel yang pertama kali bereaksi ketika terjadinya ekstrusi larutan irigasi ke jaringan periradikuler (Evren *et al*, 2016). Untuk mendapatkan hasil penelitian yang representatif terhadap kondisi rongga mulut manusia (*in vivo*) maka fibroblas yang digunakan dalam penelitian ini adalah *human primary fibroblast* yang berasal dari ligamen periodontal *Human primary fibroblast* yang merupakan kultur sel primer dinilai lebih representatif terhadap kondisi *in vivo* karena kromosomnya yang belum mengalami perubahan dan mutasi sehingga sifatnya masih sama dengan jaringan asalnya (Rittie dan Fisher, 2005). Sehingga pada penelitian ini, dilakukan pengujian toksisitas terhadap sel fibroblas pada ligamen periodontal manusia.

Metode uji toksisitas yang digunakan adalah dengan metode *MTT Assay*. Metode ini merupakan salah satu metode yang umum digunakan untuk menetapkan jumlah sel kultur karena memiliki cara kerja yang sederhana, cepat, sensitif, akurat, dan digunakan pada pengujian awal dari ekstrak tumbuhan

(Baharum *et al*, 2016). Prinsip dari metode MTT adalah terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) oleh sistem reduktase. Suksinat tetrazolium yang termasuk dalam rantai respirasi dalam mitokondria sel-sel yang hidup membentuk kristal formazan berwarna ungu dan tidak larut air. Penambahan *reagen stopper* (bersifat detergenik) akan melarutkan kristal berwarna ini yang kemudian diukur absorbansinya (*Optical Density*) menggunakan *Microplate Reader*. Intensitas warna ungu yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel hidup. Sehingga jika intensitas warna ungu semakin besar, maka berarti jumlah sel hidup semakin banyak (CCRC, 2012).

Pada penelitian ini, pembuatan ekstrak kulit buah coklat (*Theobroma Cacao.L*) berjenis *Forastero* yang berasal dari Banyuwangi dilakukan di Laboratorium Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Widya Mandala Surabaya. Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi dengan etanol 70%. Metode maserasi dipilih karena *Theobroma Cacao L* diketahui memiliki kandungan fenolik cukup tinggi yang memiliki anti oksidan, sehingga metode tersebut paling baik untuk mengekstraksi kandungan polifenol. Sedangkan pelarut etanol dipilih sebab pelarut tersebut memiliki gugus hidroksil yang dapat mengikat senyawa-senyawa polar seperti flavonoid dan alkaloid (Baharum *et al*, 2016).

Hasil penelitian uji sitotoksitas ekstrak kulit buah coklat terhadap sel fibroblas ligamen periodontal manusia dalam konsentrasi 3000 µg/ml; 1500 µg/ml; 750 µg/ml; 375 µg/ml; 187,5 µg/ml; 93,75 µg/ml; 46,875 µg/ml; 23,4375 µg/ml; 11,7187 µg/ml; 5,8593 µg/ml menunjukkan persen kematian sel sebesar 75,684%; 62,255%; 50,130%; 43,415%; 42,372%; 41,460%; 39,113%; 29,530%; 27,346%; 18,415%. Dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi

konsentrasi yang digunakan, maka semakin tinggi pula persen kematian sel fibroblas ligamen periodontal manusia.

Hal tersebut diakibatkan oleh toksisitas suatu material yang dipengaruhi kandungan zat aktif dalam material yang digunakan. Tidak semua konsentrasi dapat menyebabkan toksisitas pada sel fibroblas ligamen periodontal. Menurut Cotran *et al* (2014), jejas pada sel dipengaruhi oleh berat ringannya stimulus yang mengenai sel tersebut. Konsentrasi suatu bahan dapat mempengaruhi berat dan ringannya stimulus tersebut (Harsini, 2016). Pada konsentrasi 750, 1500, 3000 µg/ml terjadi kematian sel lebih dari 50%, hal ini dikarenakan senyawa-senyawa yang terkandung dalam konsentrasi tersebut memiliki aktivitas yang lebih toksik dibandingkan dengan konsentrasi dibawah 375 µg/ml. Pada konsentrasi rendah, senyawa-senyawa aktif dalam ekstrak kulit buah coklat bersifat non toksik terhadap sel sehingga kematian sel yang terjadi semakin rendah.

Identifikasi taksonomi tanaman dan analisa kandungan zat fitokimia dilakukan di Balai Penelitian dan Konsultasi Industri Surabaya. Hasil analisa zat fitokimia diperoleh hasil sebagai berikut: Tanin (2,11%), Alkaloid (2,89%), Terpenoid (0,98%), Flavonoid (1,08%), Saponin (3,01%), dan Theobromine (2,82%). Kandungan terbanyak yang dimiliki ekstrak kulit buah coklat pada penelitian ini adalah *saponin*, kemudian diikuti oleh *alkaloid*, *theobromine*, *tanin*, *flavonoid*, dan *terpenoid*.

Saponin merupakan kandungan senyawa terbanyak yang terdapat dalam ekstrak kulit buah coklat sehingga berperan besar dalam penyebab kematian sel akibat sifat toksisitasnya. Saponin adalah glikosida triterpenoid dan sterol. Saponin berasal dari bahasa latin "*sapo*" yang berarti sabun, diberi nama demikian karena sifatnya yang menyerupai sabun. Pada konsentrasi yang tinggi, saponin bersama dengan flavonoid akan menimbulkan efek toksik terhadap sel.

Kedua senyawa tersebut dapat menghambat proliferasi sel dan mengakibatkan kerusakan mitokondria akibat terjadinya peningkatan  $\text{Ca}^{2+}$  pada mitokondria sehingga terbentuk *mitochondrial permeability transition pore* (Ogunbayo & Michelangeli, 2013). Peningkatan  $\text{Ca}^{2+}$  pada mitokondria terjadi akibat terhambatnya  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase. Terbentuknya *mitochondrial permeability transition pore*, akan mengakibatkan fosforilasi oksidatif dan pembentukan ATP terhambat. Terhambatnya fosforilasi oksidatif dapat menyebabkan terjadinya kematian sel, sedangkan berkurangnya produksi ATP melalui beberapa proses sebelum terjadinya kematian sel. Berkurangnya produksi ATP akan mengakibatkan transpor aktif  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  terganggu sehingga terjadi influx  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}^+$  dan Eflux  $\text{K}^+$ , kemudian terjadi pembengkakan sel dan retikulum endoplasma, *microvilli blebs* hilang. Hal tersebut mengakibatkan pecahnya membran plasma, organel, dan nukleus, dan keluarnya komposisi-komposisi yang berada di dalam sel (Kumar *et al*, 2015). Saponin dalam konsentrasi yang tidak tepat juga dapat mengakibatkan terjadinya kelebihan radikal bebas yang disebut dengan stres oksidatif sehingga menyebabkan terjadinya kematian sel. Tingginya radikal bebas atau *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) dapat menyebabkan kerusakan mitokondria yang memicu terjadi kegagalan fosforilasi oksidatif dan berkurangnya ATP yang dibutuhkan dalam proses sintesa sel, sehingga terjadi kematian sel (Sanchez, 2015). Radikal bebas sendiri juga mengakibatkan peroksidase lipid sehingga terjadi kerusakan membran sel yang berakibat pada perubahan tekanan osmotik di dalam sel. Perubahan tersebut mengakibatkan sel membengkak dan terjadi kematian sel (Panche *et al*, 2016).

Alkaloid yang terkandung dalam kulit buah coklat berperan pula dalam terjadinya proses kematian sel. Alkaloid merupakan senyawa metabolit sekunder

terbanyak yang memiliki atom nitrogen dan sebagian besar bersumber dari tumbuh-tumbuhan, terutama angiosperm (Retno, *et al*. 2016). Alkaloid memiliki efek negatif terhadap sel akibat terjadinya perubahan membran lipid yang diketahui membantu pemasukan ion kalsium ke dalam sel, peningkatan ion kalsium yang masuk ke dalam membran berakibat merangsang ikatan membran dengan cAMP interseluler. Peningkatan permeabilitas membran sel dapat menyebabkan cairan elektrolit di luar sel akan mudah masuk ke dalam sel, akibatnya sel akan jadi membengkak dan mudah pecah (Wurlina, 2006). Hal tersebut diakibatkan karena adanya peningkatan  $\text{Ca}^{2+}$  pada mitokondria sehingga terjadi peningkatan *phospholipid degradation* yang dapat menyebabkan terbentuknya *lipid breakdown products*. Karena adanya kerusakan pada lapisan *lipid* yang berada pada membran plasma, membran plasma mengalami kerusakan sehingga sel tersebut kehilangan keseimbangan osmotik, terjadinya influx cairan ekstraseluler dan ion, dan terjadi kehilangan komponen seluler yang berakibat sel tersebut mati atau nekrosis (Kumar *et al*, 2015).

Tanin yang terkandung cukup tinggi dalam kulit buah coklat merupakan salah satu senyawa kimia turunan polifenol. Pada konsentrasi tinggi, tanin memiliki afinitas atau ketertarikan yang tinggi terhadap protein sehingga tanin mampu merusak susunan dan permeabilitas dinding sel akibat pembentukan senyawa kompleks dengan protein melalui ikatan hidrogen. Hal tersebut mengakibatkan struktur protein terganggu, dan protein tidak dapat berfungsi lagi sehingga terjadi denaturasi protein. Denaturasi tersebut mengganggu metabolisme dan fungsi fisiologis sel sehingga terjadi perubahan permeabilitas pada dinding sel yang mengakibatkan sel mengalami lisis dan akhirnya akan terjadi kematian sel (Moosophon *et al*, 2010).

Senyawa aktif tanin dan golongan flavonoid diketahui memiliki sifat antioksidan yang dapat menurunkan efek oksidatif dari ROS pada sel, sehingga kedua senyawa tersebut dapat meningkatkan viabilitas sel. Sedangkan tanin yang termasuk dalam golongan polifenol, dapat menurunkan oksidasi radikal bebas dengan kemampuannya mengikat ion metal dan radikal bebas yang dapat memicu munculnya ROS (Tarique, 2016). Sedangkan, Flavonoid memiliki kemampuan menstabilkan ROS dengan cara bereaksi dengan komponen reaktif dari radikal bebas. Gugus hidroksil yang terkandung dalam flavonoid menjadikan radikal bebas menjadi inaktif akibat reaksi yang berikatan dengan *superoxide* dan *peroxynitrite* (Panche *et al*, 2016). Selain itu senyawa tersebut dapat menghambat enzim *Xanthine Oxidase* (XO), suatu enzim yang dapat memicu keluarnya oksigen reaktif seperti *superoxide radical* dan *hydrogen peroxide* (Ying *et al*, 2014). Selain itu, Flavonoid yang berinteraksi dengan lapisan hidrofobik dari membran dapat mencegah masuknya oksidan dan melindungi struktur, fungsi dari membran itu sendiri (Tarique, 2016).

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, telah ditemukan nilai  $LC_{50}$  (*Lethal Concentration*) yaitu konsentrasi 750  $\mu\text{g/ml}$ . Konsentrasi tersebut menyebabkan kematian sel fibroblas lebih dari 50% sebesar 50,130% sehingga konsentrasi diatas atau sama dengan 750  $\mu\text{g/ml}$  tidak dapat digunakan sebagai larutan irigasi karena bersifat toksik, dan konsentrasi dibawah 750  $\mu\text{g/ml}$  merupakan konsentrasi aman jika digunakan sebagai larutan irigasi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Garg, Nisha., Garg, Amit. 2014. Textbook of Endodontics 3<sup>rd</sup> Edition. India : Jaypee Publishing. P: 211-213.
- Plotino, Gianluca., Cortese, Teresa., Grande, Nicola., Leonardi, Denise. 2016. New Technologies to Improve Root Canal Disinfection. Brazilian Dental Journal. 27(1) : 3-8.
- Kim, M., Kim, J., Lim, S. 2015. Accidental Extrusion of Sodium Hypochlorite during Endodontic Treatment in a Primary Tooth. Journal Korean Academy Pediatric Dentistry. 42(3): 264-269.
- Ristyawati, Dina. 2017. Uji Toksisitas Larutan Irigasi NaOCL dan Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia Mangostin L.*) pada *Human Periodontal Ligament Fibroblast Cells* (HPdLFC). Departemen Konservasi Gigi Fakultas Kedokteran Gigi. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Ok, Evren., Adanir, N., Hakki, S. 2016. Comparison of cytotoxicity of various concentrations origanum extract solution with 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite. European Journal of Dentistry. 9(1) : 6-10.
- Elizabeth, Makkunrai. 2017. Uji Sitotoksisitas Sodium Hipoklorit dan Qmix Pada Kultur Sel Human Periodontal Ligamen Fibroblas. Departemen Konservasi Gigi Fakultas Kedokteran Gigi. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia. 2010. Budidaya Kakao. Jakarta: Agromedia Pustaka. Hal. 25-31.
- Azizah, DN., Kumolowati, E., Faramayuda, F. 2016. Penetapan Kadar Flavonoid Metode  $\text{AlCl}_3$  Pada Ekstrak Metanol Kulit Buah Kakao (*Theobroma Cacao L.*). Kartika Jurnal Ilmiah Farmasi. 2(2): 45-49.
- Putri, Dania V. 2017. Daya Antibiofilm Ekstrak Kulit Buah Coklat (*Theobroma cacao*) terhadap bakteri *Enterococcus Faecalis*. Surabaya : Universitas airlangga. P: 48-56.
- Basu, B. 2017. Probing Toxicity of Biomaterials and Biocompatibility Assesment. Singapore : Springer. P: 291-351.

11. Zhang, M., Aguilera, D., Das, C., Vasquez, H., Zage, P. 2007. *Measuring Cytotoxicity : A New Perspective on LC<sub>50</sub>*. *Anticancer Research*. 27 : 35-38.
12. Souto, L., Alvaro, A., Teixeira, D., Bastos, A., Jose, L., Daniel, P. 2013. Cytotoxicity of acrylic based resin compounds in a human gingival fibroblast cell line. *Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac*. 54(2) : 87-90.





