

15

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

**KONSENTRASI HAMBAT MINIMAL EKSTRAK BIJI  
COKLAT (*Theobroma cacao*) JENIS *CRIOLO* TERHADAP  
BAKTERI *Streptococcus viridans***

**SKRIPSI**



MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

**Oleh:**

**NINA DHANIAR**  
**020710016**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS AIRLANGGA BHMN  
SURABAYA  
2010**

**KONSENTRASI HAMBAT MINIMAL EKSTRAK BIJI  
COKLAT (*Theobroma cacao*) JENIS *CRIOLLO*  
TERHADAP BAKTERI *Streptococcus viridians***

**SKRIPSI**

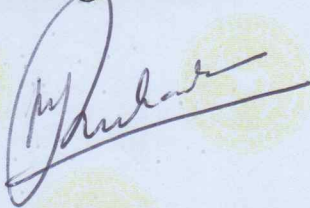
**Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat untuk Menyelesaikan  
Pendidikan Dokter Gigi di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas  
Airlangga Surabaya**

**Oleh:**

**NINA DHANIAR**  
**020710016**

**Menyetujui :**

**Pembimbing Utama**



**M. Rulianto, drg., Sp.KG(K), M.S.**  
**NIP. 19540810.198002.1.001**

**Pembimbing Serta**



**Slamet Soetanto drg., Sp.KG(K)**  
**NIP. 19490328.197802.1.001**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS AIRLANGGA BHMN  
SURABAYA  
2010**

**Skripsi ini telah diuji pada tanggal 21 Desember 2010**

**PANITIA PENGUJI SKRIPSI**

- 1. Nanik Zubaidah, drg., Sp.KG(K), M.Kes (ketua penguji)**
- 2. M. Rulianto, drg., Sp.KG(K), M.S (pembimbing utama)**
- 3. Slamet Soetanto drg., Sp.KG(K) (pembimbing serta)**
- 4. Widya Saraswati, drg., MKes (anggota)**
- 5. Setyabudi, drg., Sp.KG(K), MARS (anggota)**

## UCAPAN TERIMAKASIH

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur pada Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat dan karuniaNya sehingga skripsi ini dapat diselesaikan.

Perkenankanlah saya mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. RM. Coen Pramono Danudiningrat, drg., SU., Sp.BM(K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga yang telah memberi kesempatan untuk menempuh pendidikan di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.
2. Prof. DR. Adioro Soetojo, drg., Sp.KG(K), MS., selaku Ketua Departemen Konservasi Gigi yang telah memberikan ijin untuk pembuatan skripsi.
3. M. Rulianto, drg., Sp.KG(K), M.S., selaku Dosen Pembimbing Utama, yang selalu sabar dan meluangkan waktu memberikan bimbingan ilmu, bimbingan moral dan psikis sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
4. Slamet Soetanto drg., Sp.KG(K), selaku Dosen Pembimbing Serta yang selalu mengarahkan dan mengevaluasi setiap tahapan pengerjaan skripsi ini sehingga dapat terselesaikan dengan baik.
5. Nanik Zubaidah, drg., Sp.KG(K), M.Kes., Widya Saraswati, drg., MKes., dan Setyabudi, drg., Sp.KG(K), MARS., selaku dosen penguji yang telah memberikan masukan dan arahan sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.

6. M Jusri., drg., Sp.PM., M.S., selaku dosen wali yang telah memberikan bimbingan untuk kelancaran studi di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.
7. Prof. Dr. Jenny Sunariani, drg., MS. Selaku Ketua Departemen Biologi Oral yang telah memberikan ijin melakukan penelitian di Laboratorium Mikrobiologi, Pak Damam dan staf Departemen Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga yang membantu proses pembuatan ekstrak biji coklat, Mas Eta Radhianto dan Mbak Nur selaku staf Lab. Mikrobiologi yang membantu pelaksanaan penelitian, serta untuk Adi Hapsoro, drg. M.S., atas bantuan mengolah data dan statistik.
8. Keluarga besar saya, Papah Yuwono HS dan Ibu Suluh Tutik tercinta, Mbak Ria, Mbak Citra, Mas Wawan, Mas Riki, Mbak nona, keponakanku fara, caca, lala, naura, dan mak ami tercinta. Terima kasih atas cinta kasih, kepercayaan, doa, harapan, dukungan moril, psikis, finansial dan teguran selama ini sehingga bisa sampai dalam tahapan ini. Terimakasih untuk semuanya.
9. Astri Paramarthaputri, Layinuvar Anggia Rizka, Novita Buniatin, Bramantya Pradipta, Kemal Jamaluddin, Ardi Winarno, dan keluarga besar formasi, isocorp, iProMedt, bisnis plan "Jilbabholic" dan semua anggota jakarta dan el punky, terimakasih atas dukungan dan motivasi selama ini, atas empati dan kerjasama, terimakasih untuk menjadi kontrol sosialku.

10. Mar-Sist Mamot, Ekhan, Arlince, Risa, Restak, Mei, dan fita.

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Terimakasih Mar-Sist susah dan senang menemani saya dalam setiap langkah menuju gelar drg., terimakasih atas persahabatan yang luar biasa ini, atas semua senyum dan tangis bersama, atas semua motivasi dan nasehat. Terimakasih.

11. Dosen pengajar FKG UNAIR, Teman-teman mahasiswa FKG angkatan 2007, SCC, HMI, dan semua pihak yang membantu dan tidak bisa disebutkan satu persatu, terimakasih untuk ilmu, pengalaman dan persahabatan ini.

Diharapkan skripsi ini memberikan manfaat bagi semua pihak yang memerlukan.

Surabaya, Desember 2010

Penulis

MINIMAL INHIBITORY CONCENTRATION OF *CRIOLLO* CACAO  
BEAN EXTRACT (Theobroma cacao) ON *Streptococcus viridans*

**ABSTRACT**

**Background.** Cacao (*Theobroma cacao*) have received a lot of attentions due to their significant polyphenol contents. Cacao beans are well known as a natural product to contain polyphenols (catechin, anthocyanins, and proanthocyanidins) that have an antimicrobial effect. *Streptococcus viridans* is a normal flora of oral cavity, but in another side it is one of the main caused bacteria found in dental pulp and periapical lessions. The alternative way to inhibit the growth of the bacteria to control the change of normal flora by using natural products as antimicrobial. **Purpose.** The aim of this study is to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) on *Streptococcus viridans*. **Method.** This research was a laboratory experimental study. The extract of cacao bean was made with maceration method. A serial dilution method was used to determine the MIC of cacao bean on *Streptococcus viridans*, then continued with colony count as a crosscheck. **Result.** Cacao bean extract had MIC of 3,13% and based on the colony counting showed that the colony of streptococcus viridans significantly decreased as the extract concentration increased. **Conclusion.** MIC value of cacao bean extract on streptococcus viridans is 3,13%.

**Keywords:** Cocoa Bean Extract, Polyphenols, *Streptococcus viridans*, MIC.

	<b>Halaman</b>
Sampul Dalam.....	i
Lembar Pengesahan.....	ii
Penetapan Panitia Penguji Skripsi .....	iii
Ucapan Terimakasih .....	iv
Abstract.....	vii
Daftar Isi.....	viii
Daftar Tabel.....	xi
Daftar Gambar.....	xii
Daftar Lampiran.....	xiii
<b>BAB I PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Tujuan Penelitian .....	4
1.4 Manfaat .....	4
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>5</b>
2.1 Perawatan Saluran Akar .....	5
2.1.1 Irigasi Saluran akar .....	5
2.1.2 Syarat Bahan Irigasi Saluran Akar .....	6
2.2 Mikroorganisme Saluran Akar .....	7
2.2.1 Streptococcus .....	9
2.2.2 Streptococcus viridans .....	11



2.3	Coklat .....	12
	IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA	
2.3.1	Biji Coklat .....	13
2.3.2	Kandungan dan Khasiat Biji Coklat .....	14
2.4	Antibakteri .....	16
2.5	Metode Uji Antibakteri .....	17
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS .....		19
3.1	Kerangka Konsep Penelitian .....	19
3.2	Hipotesis Penelitian .....	21
BAB IV METODE PENELITIAN .....		22
4.1	Jenis Penelitian .....	22
4.2	Populasi Penelitian .....	22
4.3	Sampel Penelitian .....	22
4.3.1	Teknik Pengambilan Sampel .....	22
4.3.2	Besar Sampel .....	22
4.4	Variabel Penelitian .....	23
4.5	Definisi Operasional .....	23
4.6	Alat dan Bahan Penelitian .....	24
4.7	Lokasi dan Waktu Penelitian .....	25
4.8	Cara Kerja .....	25
4.8.1	Sterilisasi Alat dan bahan yang akan digunakan .....	25
4.8.2	Pembuatan ekstrak biji coklat .....	26
4.8.3	Persiapan kultur <i>Streptococcus viridans</i> .....	26

4.8.4. Penentuan Konsentrasi Hambat Minimal Ekstrak Biji Coklat IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA terhadap Streptococcus viridans dilakukan dengan metode penipisan seri .....	27
4.9 Uji Statistik .....	28
4.10 Alur Penelitian .....	29
BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA.....	30
BAB VI PEMBAHASAN.....	35
BAB VII SIMPULAN DAN SARAN.....	39
7.1. Simpulan.....	39
7.2. Saran.....	39
DAFTAR PUSTAKA.....	40
LAMPIRAN.....	45

## Daftar Tabel

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

	<b>Halaman</b>
Tabel 5.1. Hasil Pengamatan Pengenceran Seri.....	30
Tabel 5.2. Rata-rata dan Standar Deviasi Hasil Penghitungan Koloni.....	33
Tabel 5.3. Nilai p hasil uji <i>Kolmogorov Smirnov Test</i> dan <i>Levene's Test</i> pada kelompok penghitungan jumlah koloni <i>Streptococcus viridans</i> .....	33

## Daftar Gambar

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

	<b>Halaman</b>
Gambar 2.1. Struktur kimia catechin (flavan-3-ols).....	14
Gambar 2.2. Struktur kimia proanthocyanidin .....	14
Gambar 2.1. Struktur kimia anthocyanidin .....	15
Gambar 5.1. Hasil penanaman control positif pada media <i>blood agar</i> .....	31
Gambar 5.1. Hasil penanaman konsentrasi 1,56% pada media <i>blood agar</i> ....	32
Gambar 5.1. Hasil penanaman konsentrasi 3,13% pada media <i>blood agar</i> ....	32
Gambar 5.1. Hasil penanaman konsentrasi 6,25% pada media <i>blood agar</i> ...	32

## Daftar Lampiran

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

1. Hasil Pengamatan Visual Kekeruhan Pada Metode Dilusi
2. Penghitungan koloni pada konsentrasi 6,25%
3. Penghitungan koloni pada konsentrasi 3,13%
4. Penghitungan koloni pada konsentrasi 1,56%
5. Penghitungan koloni pada control +
6. Test Distribusi Normal Konsentrasi 3,13 %
7. Test Distribusi Normal Konsentrasi 1,56 %
8. Test Distribusi Normal Kontrol +
9. Oneway Anova
10. Post Hoc Tests
11. Homogeneous Subsets
12. Surat keterangan identifikasi Biji Coklat

**BAB I**  
**PENDAHULUAN**

### 1.1. Latar Belakang Masalah

Pada bidang Konservasi Gigi, perawatan saluran akar merupakan salah satu macam perawatan endodontik. Perawatan tersebut dilakukan untuk mempertahankan gigi selama mungkin dalam rongga mulut. Perawatan saluran akar dilakukan dengan membuang seluruh jaringan pulpa, baik di dalam ruang pulpa maupun saluran akar. Perawatan saluran akar memiliki tiga prinsip utama, yaitu preparasi saluran akar, sterilisasi dan pengisian saluran akar (Tronstad, 2003).

Mikroorganisme dan produknya merupakan penyebab utama kelainan pulpa dan periapikal. Dari berbagai spesies bakteri yang dikenal sebagai flora normal rongga mulut, hanya sebagian kecil saja yang dapat diisolasi dari pulpa yang terinfeksi. Bakteri yang banyak diidentifikasi dalam ruang pulpa adalah bakteri anaerob *obligate* (Ingle dan Bakland, 2002). Mikroorganisme yang sering menimbulkan kerusakan pada pulpa adalah *Streptococcus*, *Clostridium*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Peptococcus*, *Eubacterium*, *Actinomyces*, *Lactobacillus*, dan *Peptostreptococcus* (Ingle dan Bakland, 2002; Prasasti, 2009).

Sebagian besar penyebab infeksi *pulpa* dan infeksi jaringan *periapikal* adalah fakultatif anaerob dan *obligate* anaerob seperti *Fusobacterium nucleatum* dan *Streptococcus*. *Streptococcus* ditemukan sejumlah 40% pada kultur bakteri yang diidentifikasi dari saluran akar gigi dengan gambaran radiologi radiolusen pada apical gigi (Ingle dan Bakland, 2002).

*Streptococcus mitis* dan *streptococcus salivarius* merupakan bagian dari *Streptococcus viridans* yang sering dijumpai pada rongga mulut, juga saluran akar. Bakteri yang terdapat pada pulpa dapat menyebabkan inflamasi, saluran akar akan terinfeksi sehingga jaringan pulpa menjadi nekrotik. Gigi yang mengalami kematian pulpa memerlukan perawatan saluran akar (Tronstad, 2003).

Pada tahap pertama perawatan saluran akar dilakukan preparasi kemomekanik. Pada preparasi kemomekanik dilakukan tindakan pencucian atau pembersihan dengan memasukkan bahan irigasi ke dalam saluran akar. Bahan irigasi diharapkan dapat melarutkan kotoran organik dan anorganik, melumasi alat endodontik, membunuh mikroba, tidak toksik, dan ekonomis (Tronstad, 2003).

Indonesia sejak dulu telah mengenal dan memanfaatkan tumbuhan berkhasiat sebagai salah satu upaya menanggulangi masalah kesehatan. Pengetahuan tentang pemanfaatan tumbuhan obat tersebut merupakan budaya bangsa berdasarkan pengetahuan dan pengalaman yang diwariskan secara turun temurun (Nugrohowati, 2005; Sanjaya, 2007). Salah satu tumbuhan yang telah terbukti bermanfaat dalam kesehatan adalah coklat (Kim et al, 2000). Coklat banyak diproduksi di Indonesia, dilaporkan bahwa Indonesia merupakan negara produsen coklat ke tiga terbesar di dunia setelah Ghana dan *Coach d'Ivoire*. Daerah pengembangan perkebunan coklat tersebar di 29 provinsi dengan sentra produksi Provinsi Sulawesi Selatan, Sulawesi Tengah, Sumatera Utara, Kalimantan Timur, Nusa Tenggara Timur dan Jawa Timur (Taufik, 2007). Pemanfaatan coklat dalam dunia kesehatan, khususnya di Indonesia, didukung oleh kondisi tersebut. Beberapa penelitian telah dilakukan untuk pemanfaatan coklat dalam dunia kesehatan. Salah satunya adalah Trilaksana (2009),



menyatakan bahwa ekstrak kulit buah coklat memiliki daya antibakteri terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans*.

Biji coklat, suatu bahan aktif dari coklat, yang memiliki komponen monomer *polyphenol* yang cukup tinggi. Tiga golongan *Polyphenol* yang terdapat pada biji coklat adalah *catechin* (flavan-3-ol). *Anthocyanin*, *proanthocyanin* (*procyanidine 1* dan *procyanidin 2*). *Procyanidin* dapat menghambat atau membunuh bakteri dengan cara membentuk kompleks dengan senyawa pada dinding sel bakteri atau enzim sehingga menyebabkan perubahan morfologi membran sel dan enzim ekstraseluler yang disekresi oleh bakteri (Patra & Saxena, 2009). Selain itu, *procyanidin* juga menyebabkan reduksi ion metal sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri (Okoro *et al.*, 2010; Smullen *et al.*, 2007), sedangkan mekanisme *anthocyanin* sebagai antibakteri sama dengan katekin, yaitu merusak membran sel bakteri. *Polyphenol* tersebut, bersama dengan asam *oleic* dan asam *linoleic* dilaporkan memiliki aktivitas menghambat *glukosil transferase* dari *streptococcus mutans* (Kim *et al.*, 2000; Srikanth, 2008). *Polyphenol* mempunyai sifat desinfektan, antisptik, bakteriostatik, dan bakterisid karena mempunyai kemampuan merusak membran sel bakteri. *Polyphenol* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dengan cara merusak membran sel bakteri (lipid bilayer) sehingga menyebabkan tegangan permukaan dinding sel bakteri menurun dan permeabilitas dari membran sel meningkat, sehingga tekanan di dalam membran sel meningkat (Yamazaki *et al.*, 2003). Peningkatan membran sel dapat mengakibatkan kebocoran intrasel, hal tersebut dapat merusak sel bakteri *Streptococcus mutans*. Pada penelitian sebelumnya, telah dilakukan uji daya antibakteri ekstrak biji coklat terhadap *Streptococcus*

*mutans* dengan KHM sebesar 0,4% dan KBM 6,4% (Smullen et al., 2007).

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Namun sampai saat ini belum terdapat penelitian mengenai daya antibakteri ekstrak biji coklat terhadap *Streptococcus viridians*. Dengan demikian pada penelitian ini diharapkan dapat mengungkap apakah bahan polyphenol yang terdapat pada ekstrak biji coklat (*Theobroma cacao*) jenis (cultivar) *criollo* mempunyai daya antibakteri terhadap *streptococcus viridans* dan pada konsentrasi berapakah dapat menghambat pertumbuhan bakteri tersebut, sehingga nantinya dapat digunakan sebagai bahan irigasi saluran akar yang aman, murah dan dapat digunakan pada pelayanan gigi masyarakat di daerah pelosok karena biji coklat dapat diperoleh di beberapa daerah di indonesia.

## **1.2. Rumusan Masalah**

Berapakah nilai konsentrasi hambat minimal (MIC) ekstrak biji coklat sebagai antibakteri terhadap *Streptococcus viridans*?

## **1.3. Tujuan Penelitian**

Untuk mengetahui nilai konsentrasi hambat minimal ekstrak biji coklat sebagai antibakteri terhadap *Streptococcus viridians*.

## **1.4. Manfaat**

Dengan adanya penelitian ini diharapkan dapat menambah informasi tentang konsentrasi hambat minimal ekstrak biji coklat sebagai antibakteri terhadap *Streptococcus viridians*, yang kemudian dapat digunakan lebih lanjut sebagai alternatif bahan irigasi saluran akar yang mudah diperoleh dan murah dalam perawatan di bidang konservasi gigi.

**BAB II**  
**TINJAUAN PUSTAKA**

**2.1. Perawatan Saluran akar**

Perawatan saluran akar merupakan salah satu perawatan endodontik yang berhubungan dengan diagnosa dan perawatan dari penyakit pulpa dan jaringan periapikal. Perawatan endodontik merupakan suatu usaha menyelamatkan gigi terhadap tindakan pencabutan agar gigi dapat bertahan dalam *socket*. Adapun macam perawatannya antara lain *pulp capping*, *pulpotomy*, *pulpectomy*, *endo intracanal* (Fessi, 2009).

Prinsip perawatan saluran akar meliputi preparasi kemomekanik, sterilisasi dan pengisian saluran yang bertujuan untuk mempertahankan gigi selama mungkin dalam rongga mulut. Pada tahap preparasi kemomekanik dilakukan pembuangan jaringan nekrotik beserta koloni bakteri secara mekanis, dan dilakukan irigasi saluran akar sebagai suatu preparasi yang bersifat kimiawi aktif dengan harapan agar semua jaringan nekrotik beserta koloni bakteri di dalam saluran akar akan ikut mengalir keluar bersama dengan cairan irigasi (Tronstad, 2003).

**2.1.1. Irigasi Saluran akar**

Irigasi adalah suatu tindakan pencucian atau pembersihan dengan memasukkan bahan irigasi ke dalam saluran akar. Irigasi bertujuan untuk mengalirkan semua kotoran yang berada di dalam saluran akar ke luar bersama-sama dengan suatu bahan irigasi (Wulandari, 2000).

Tindakan irigasi saluran akar merupakan salah satu tahap perawatan saluran akar yang penting, sebab jika diabaikan dapat menyebabkan kegagalan perawatan. Nevi Yanti (2000) menyatakan bahwa dinding saluran yang tidak bersih dapat menjadi tempat persembunyian bakteri, mengurangi perlekatan bahan pengisi saluran akar dan meningkatkan celah apikal. Selama dan sesudah pembersihan dan pembentuk saluran harus diirigasi untuk menghilangkan fragmen jaringan pulpa dan serpihan dentin yang menumpuk. Selain itu, irigasi juga dapat membersihkan debris makanan bila saluran dibiarkan terbuka untuk drainase selama abses alveolar akut. Jumlah debris yang dibuang oleh bilasan larutan irigasi saluran akar merupakan faktor yang lebih berpengaruh terhadap kebersihan saluran akar dibandingkan dengan efek melarutkan jaringan (Yanti, 2000).

### **2.1.2. Syarat Bahan Irigasi Saluran Akar**

Suatu larutan irigasi saluran akar yang baik harus mampu melarutkan kotoran organik dan anorganik, melumasi alat endodontik, membunuh mikroba, tidak toksik, dan ekonomis (Yanti, 2000; Tronstad, 2003). Larutan irigasi yang paling baik adalah mempunyai daya antimikroba yang maksimal dengan toksisitas yang minimal. Setiap bahan yang dipakai di bidang kedokteran gigi, termasuk bahan irigasi harus memenuhi syarat-syarat biokompatibilitas (dapat diterima oleh jaringan tubuh) yaitu tidak membahayakan pulpa dan jaringan lunak, tidak mengandung substansi yang bisa menyebabkan respon sistemik bila berdifusi dan diadsorpsi ke dalam sistem sirkulasi, dan bebas dari agen sensitisasi yang dapat menyebabkan respon alergi serta tidak berpotensi karsinogenik. Tetapi dari hasil

studi secara *in vitro* dan *in vivo* terhadap berbagai larutan irigasi yang potensial belum ada bahan yang memenuhi syarat tersebut (Yanti, 2000).

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

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. Tidak ada satupun larutan irigasi yang benar-benar biokompatibel, oleh karena itu perlu diperhatikan indikasi dan kontra indikasi dari setiap larutan irigasi. Selain itu, tindakan irigasi juga harus dilakukan dengan hati-hati dan memakai teknik yang benar untuk menjamin keberhasilan perawatan saluran akar (Yanti, 2000).

## **2.2. Mikroorganisme Saluran Akar**

Mikroorganisme merupakan penyebab utama dari penyakit pulpa dan jaringan periradikuler. Mikroorganisme pada pulpa umumnya berasal dari karies. Mikroorganisme tersebut menghasilkan produk toksin yang berpenetrasi ke dalam pulpa melalui tubulus dentin. Beberapa penelitian mengungkapkan bahwa lesi kecil pada enamel juga dapat mempengaruhi termobilisasinya sel-sel inflamasi dalam pulpa. Akibat adanya mikroorganisme beserta produknya dalam dentin, pulpa akan terinfiltrasi secara lokal (di dasar tubulus yang terkena karies) terutama oleh sel-sel radang kronis seperti makrofag, limfosit, dan sel-sel plasma (Prasasti, 2009)

Dari sekitar 350 spesies bakteri dalam rongga mulut, hanya sebagian kecil saja yang dapat diisolasi dari pulpa yang terinfeksi, beberapa diantaranya adalah bakteri anaerob sejati (98%), beberapa anaerob fakultatif dan sedikit sekali bakteri

aerob (Ingle dan Bakland, 2002). Mikroorganisme yang paling sering menimbulkan kerusakan pulpa adalah *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, dan *Peptostreptococcus* (Prasasti, 2009). Tronstad (2003) menyatakan pada lesi periapikal, banyak ditemukan bakteri gram positif, frekuensi bakteri tersebut mencapai 60-80% pada daerah tersebut.

Adapun bakteri-bakteri yang dapat ditemukan dalam saluran akar adalah:

- *Cocci gram positif*: *Streptococcus viridans* meliputi *Streptococcus mutans*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *S. sanguis*, dan spesies lain seperti *S. intermedius*, *S. anginosus constellatus*, *S. milleri*, *Streptococcus group F β-*, *Staphylococcus hominis*, *S. auricularis*, *S. epidermis*, *S. aureus*, *S. capitis*, *S. warneri*, *Peptostreptococcus micros*, *P. anaerobius*, *P. magnus*, *Gamella morbillorum*.
- *Cocci gram negatif* : *Viellonella parvula*, *Morasella osloensis*.
- *Rods gram positif* : *Eubacterium lentum*, *Actinomyces odontolyticus*, *A. meyeri*, *A. israeli*, *Propionibacterium acnes*, *Corynebacterium species*, *C. pyogenes*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *Bacillus pumilus*, *Bifidobacterium*.
- *Rods gram negatif* : *Fusobacterium nucleatum*, *F. necrophorum*, *F. varium*, *F. species*, *Bacteroides intermedius*, *B. gracilis*, *B. melaninogenicus*, *B. buccae*, *B. oris*, *B. distasonis*, *B. porphomonas gingivalis*, *B. fragilis*, *B. loeshei*, *CDC Group M-S*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Menurut ada atau tidaknya molekul oksigen, bakteri anaerob pada saluran akar dapat dibagi menjadi :

- *Anaerob obligat*, merupakan organisme yang hanya tumbuh bila tidak ada oksigen .

- Anaerob fakultatif, merupakan organisme yang tumbuh dengan atau tanpa oksigen.

Kondisi pada saluran akar memungkinkan pertumbuhan bakteri anaerob yang mampu memfermentasi asam amino dan peptida untuk memperoleh energi, karena kurangnya nutrisi yang digunakan untuk memfermentasi karbohidrat. Kumpulan jaringan pulpa memberikan sumber nutrisi yang penting dalam saluran akar, sedangkan sediaan substratnya seperti serum merupakan faktor nutrisi yang terpenting dalam saluran akar. Dengan masuknya bakteri ke dalam saluran akar, maka bakteri akan menemukan tempat pembiakan ideal karena dalam saluran akar terdapat protein yang berasal dari pulpa. Keadaan ini lebih diperkaya dengan adanya eksudat CO<sub>2</sub>, nitrogen, serta suhu yang ideal bagi pertumbuhan bakteri dalam suasana anaerob (Trilaksana, 2009).

### 2.2.1. Streptococcus

*Streptococcus* adalah bakteri *spherical* gram positif yang secara khusus membentuk pasangan atau rantai dalam pertumbuhannya. Beberapa spesies *Streptococcus* adalah bakteri komensal penghuni rongga mulut, sedangkan beberapa spesies lainnya dikaitkan dengan penyakit infeksi yang diderita oleh manusia (Brooks et al, 2007).

*Streptococcus* berbentuk bulat atau lonjong dengan diameter sekitar 0,8-1,0  $\mu\text{m}$ . *Streptococcus* termasuk mikroorganisme gram positif, tidak berspora, tidak bergerak dan beberapa spesies membentuk kapsul. Spesies terbanyak dari *Streptococcus* bersifat fakultatif yaitu mikroorganisme yang dapat tumbuh dalam



keadaan dengan oksigen maupun tanpa oksigen (Brooks et al, 2007; Forbes et al, 2007).

*Streptococcus* dapat tumbuh baik dalam media *blood agar* yang mengandung 5% darah kuda atau domba. Selain itu *Streptococcus* juga dapat tumbuh baik pada media *nutrient agar*, *Muller Hinton agar* dan *Tryptone Yeast Cystine* (TYC) agar (Forbes et al, 2007, ).

*Streptococcus* berdasarkan kemampuannya dalam reaksi hemolisa darah pada *blood agar* dibedakan menjadi tiga kelompok, yaitu sebagai berikut (Brooks et al, 2007):

a. *Streptococcus*  $\alpha$  *Hemolytic* atau hemolisa sebagian

Dikenal sebagai *Streptococcus viridans*. Bakteri ini menghasilkan suatu daerah hemolisa sebagian dengan warna hijau di sekitar koloni pada *blood agar plate*. Yang termasuk dalam jenis *Streptococcus* ini antara lain *Streptococcus mitis*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus pneumonia*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*.

b. *Streptococcus*  $\beta$  *Hemolytic* atau hemolisa sempurna.

Menghasilkan suatu daerah hemolisa yang jernih sekitar koloni, yang termasuk dalam jenis *Streptococcus* ini yaitu *Streptococcus pyogens*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus anginosus*.

c. *Streptococcus*  $\gamma$  *Hemolytic* atau *Streptococcus Non Hemolytic*.

Tidak menghasilkan daerah hemolisa di sekitar koloni pada media *blood agar*, yang termasuk jenis ini adalah *Streptococcus bovis*, dan *Streptococcus faecalis* yang merupakan parasit intestinal.

## 2.2.2. *Streptococcus viridans*

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

*Streptococcus viridans* merupakan suatu mikroorganisme *alpha hemolytic*.

Koloni *Streptococcus viridans* memproduksi hemolisa sel darah merah yang dikelilingi oleh warna hijau pada sediaan kultur *blood agar*. Oleh karena itu, Mikroorganisme ini disebut dengan *Streptococcus viridans* (*viridans*: hijau). Yang termasuk golongan ini adalah *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus constellatus* dan *Streptococcus anginosus* (Topazian, 2002).

Peranan *Streptococcus viridans* telah diteliti sebelumnya, namun prevalensi mikroorganisme ini belum terlalu diinvestigasi secara mendetail. *Streptococcus viridans* merupakan faktor yang paling efektif dalam pembentukan suatu abses rongga mulut dan maksilofasial. *Streptococcus viridans* dapat menyebabkan permasalahan lokal seperti destruksi jaringan lunak dan keras rongga mulut dan maksilofasial, dan Mikroorganisme tersebut juga dapat menyebabkan suatu gangguan sistemik pada katub jantung (Revoua, Y., 2005). Bakteri ini bersifat *fakultatif anaerob*, gram positif dan berbentuk bulat (Ingle dan Bakland, 2002).

*Streptococcus viridans* tumbuh baik dalam media agar darah (*blood agar*) dan 10% darah yang dieramkan selama 48 jam pada suhu 37°C, *Streptococcus viridans* akan mati dengan pemanasan basah suhu 60°C selama 1,5 jam, sedangkan dengan pemanasan kering pada suhu 160°C selama 1 jam. Bentuk koloni *Streptococcus viridans* adalah kecil, halus, jernih, cembung dan mukoid dengan diameter 0,5-1 mm. Pada pengecatan gram tampak adanya sel berderet

menyerupai rantai, bentuk bulat dan lonjong, non motil dan tidak berspora (Fessi, 2009).

### 2.3. Coklat

Coklat atau kakao merupakan tanaman yang menumbuhkan bunga dari batang atau cabangnya. Karena itu, tanaman ini digolongkan ke dalam kelompok tanaman *caulifloris*. Adapun sistematikanya menurut klasifikasi botanis sebagai berikut :

Divisio : Spermatophyta  
Klas : Dicotyledon  
Ordo : Malvales  
Famili : Sterculiaceae  
Genus : Theobroma  
Spesies : Theobroma cacao

Coklat (*Theobroma Cacao L.*) merupakan salah satu komoditi sub sektor perkebunan yang cukup memberikan andil dalam mengatasi krisis ekonomi di Indonesia pada tahun 1997 (Taufik, 2007). Coklat juga telah menjadi sesuatu yang telah banyak dikonsumsi di berbagai negara dan budaya di dunia. Selain digunakan sebagai makanan secara fungsional, coklat juga telah diteliti potensinya untuk efek kesehatan (Rusconi, M. dan Conti A., 2010).

Perkembangan penelitian terhadap coklat telah pula membawa perubahan di dalam penggolongan coklat menurut jenisnya. Terdapat tiga jenis utama biji coklat, Criollo, Forastero, dan Trinitario (Rusconi dan Conti, 2010). Coklat telah dikenal di Indonesia sejak tahun 1560, tetapi baru menjadi komoditi yang penting

sejak 1951. Pemerintah mulai menaruh perhatian dan mendukung industri coklat pada tahun 1975. Setelah PTP VI berhasil menaikkan produksi coklat per Ha, dengan menggunakan bibit *Upper Amazone Interclonal Hybrid* yang merupakan hasil persilangan antarklon dan sabah. Jenis coklat yang ditanam saat ini sebagian besar adalah jenis *Criollo* atau *flavour cocoa*. Produksinya sebagian besar di ekspor, khususnya ke negara-negara Belanda, Jerman Barat, Amerika Serikat dan Singapura (Trilaksana, 2009).

Produksi coklat di Indonesia dihasilkan dari perkebunan besar milik negara dan swasta yang terdapat di daerah Sumatra Utara dan Jawa Timur, selain itu juga produksi yang berasal dari perkebunan rakyat yang tersebar di daerah-daerah Maluku, Sulawesi Selatan, Kalimantan Timur dan Irian Jaya (Trilaksana, 2009; Taufik, 2007).

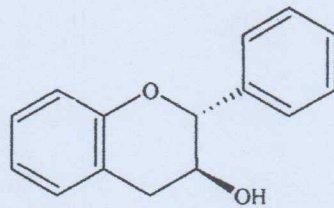
### 2.3.1. Biji Coklat

Biji coklat merupakan salah satu bagian dari coklat yang telah banyak diteliti khasiatnya untuk kesehatan. Saat ini biji coklat digunakan untuk pembuatan bubuk coklat dan coklat tablet. Biji coklat harus difermentasikan dan selama proses ini berlangsung, biji coklat dapat berubah warna. Biji coklat tidak dapat dimakan langsung karena konsentrasi *polyphenol*nya yang cukup tinggi dan biji coklat juga memiliki rasa yang sangat pahit (Rusconi, M. dan Conti A., 2010).

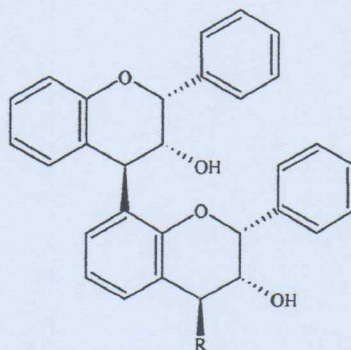
### 2.3.2. Kandungan dan Khasiat Biji Coklat

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

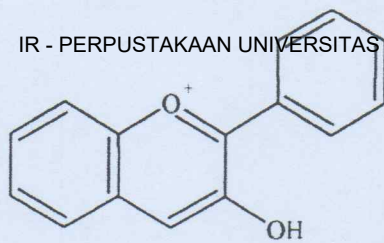
Setiap biji coklat memiliki sejumlah lemak dan *polyphenol* sebanyak 10% massa kering biji coklat. *Polyphenol* merupakan satu zat yang banyak didapatkan dalam *kingdom* tumbuhan. *Polyphenol* pada biji coklat terdapat pada sel pigmen *cotyledon*. Biji coklat memiliki range warna dari putih sampai ungu gelap, hal ini tergantung pada jumlah anthocyanin sel pigmen tersebut, yang sering disebut dengan sel penyimpan *polyphenol*. Kadar polifenol yang terdapat pada biji coklat adalah 10-12% dari berat keringnya. Ada tiga golongan polifenol yang terdapat pada biji coklat, yaitu *catechin (flavan-3-ols)* sebesar 37%, *anthocyanins* sebesar 4%, dan *proanthocyanidine (procyanidine 1 dan procyanidine 2)* sebesar 58%.



Gambar 2.1. struktur kimia *catechin (flavan -3-ols)* (Chusnie and Lamb, 2005).



Gambar 2.2. struktur kimia *proanthocyanidin* (Chusnie and Lamb, 2005).



Gambar 2.3. struktur kimia *anthocyanin* (Chusnie and Lamb, 2005).

*Catechin* (*flavan-3-ols*), dengan struktur kimia pada gambar 2.1., memiliki kandungan utama *epicatechin* yang memiliki *polyphenol* hingga 37%. Mekanisme *anthocyanin* dengan struktur kimia pada gambar 2.3., sebagai antibakteri sama dengan *catechin*, yaitu merusak membran sel bakteri. *Proanthocyanidin*, dengan struktur kimia pada gambar 2.2., dengan kandungan terbanyak, memiliki kemampuan menghambat atau membunuh bakteri dengan cara membentuk kompleks dengan senyawa pada dinding sel bakteri atau enzim sehingga menyebabkan perubahan morfologi membran sel dan enzim ekstraseluler yang disekresi oleh bakteri (Patra & Saxena, 2009). Selain itu, *proanthocyanidin* juga menyebabkan reduksi ion metal sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri (Okoro *et al.*, 2010; Smullen *et al.*, 2007). Beberapa *polyphenol* yang terdapat pada tanaman seperti pada daun teh, telah terbukti menunjukkan aktivitas menghambat *Glukosil transferase* dari *Streptococcus mutans*. Tidak semua produk alami menunjukkan aktivitas serupa, hal itu juga tergantung pada efektivitas dan stabilitas produk tersebut. Penghambatan *Glukosil transferase* oleh coklat salah satunya dikarenakan adanya komponen monomer *polyphenol*. Pada penelitian sebelumnya, telah dilakukan uji daya antibakteri ekstrak biji coklat terhadap *S. mutans* dengan KHM sebesar 0,4% dan KBM 6,4% (Smullen *et al.*, 2007). Daya antibakteri polifenol dipengaruhi oleh konsentrasinya. Kemampuan

membunuh suatu bahan antibakteri makin meningkat dengan meningkatnya konsentrasi antibakteri (White & Kolstad, 1999; Patil et al, 2007). Semakin besar konsentrasi, maka kandungan aktif zat antibakteri yang terdapat dalam ekstrak biji coklat semakin banyak (Agustin, 2007; Tanu, 2007). Peningkatan konsentrasi menyebabkan kerusakan sel yang terjadi tidak dapat diimbangi oleh kemampuan perbaikan dari sel bakteri, sehingga bakteri menjadi lisis (Katzung, B.G, 2001; J.R Farida et al, 2010).

Biji Coklat telah terbukti memiliki dua tipe substansi *cariostatic* yang dapat menghambat karies gigi secara eksperimental pada tikus yang terinfeksi *streptococcus mutans*. salah satunya menunjukkan aktivitas anti *Glukosil transferase* dan lainnya menunjukkan aktivitas antibakteri. Saat ini, telah diketahui bahwa hal yang menunjukkan aktivitas bakterisidal pada *Streptococcus mutans* adalah asam *oleic* dan *linoleic*, dan mempertunjukkan suatu aktivitas antibakteri yang tinggi pada konsentrasi 30 µg/ml(Srikanth et al, 2008).

#### 2.4. Antibakteri

Antibakteri merupakan suatu bahan yang dapat menghambat atau menghentikan pertumbuhan dan metabolisme mikroorganisme khususnya bakteri. Berdasarkan jenis daya kerjanya terhadap bakteri, antibakteri dibagi menjadi dua kelompok, yaitu bakteristatik dan bakterisida. Bakteristatik merupakan bahan yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri, sedangkan bakterisida merupakan bahan yang dapat membunuh bakteri. Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas antibakteri *in vitro* antara lain : pH lingkungan, komponen media, stabilitas obat,

suhu, ukuran *inokulum*, waktu inkubasi dan aktivitas metabolik bakteri (Tanu, 2007).

Mekanisme kerja antibakteri ada beberapa cara antara lain dengan cara mendenaturasi protein yaitu dengan (Tanu, 2007):

- merusak molekul protein dan asam nukleat sehingga dapat merusak sel tanpa dapat diperbaiki kembali
- kerusakan pada dinding sel yaitu dengan cara menghambat pembentukan dinding sel atau mengubah struktur dinding sel setelah dibentuk
- perubahan permeabilitas sel yaitu dengan merusak membran sitoplasma yang mengakibatkan terganggunya aliran keluar masuknya bahan-bahan dan rusaknya integritas komponen seluler
- Penghambatan kerja enzim yaitu dengan mengganggu reaksi kimia yang melibatkan enzim-enzim dalam sel sehingga mengakibatkan terganggunya reaksi kimia yang melibatkan enzim-enzim dalam sel sehingga mengakibatkan terganggunya metabolisme atau matinya sel
- penghambatan sintesa asam nukleat dan protein.

## 2.5. Metode Uji Antibakteri

Kemampuan suatu antibakteri serta kepekaan bakteri terhadap suatu bahan yang diberikan dapat ditentukan dengan pengukuran aktivitas antibakteri suatu bahan secara *in vitro* (Prasasti, 2009). Ada dua cara untuk menentukan aktivitas antibakteri secara *in vitro* (Forbes, 2002; Trilaksana, 2009), yaitu :



- Metode dilusi

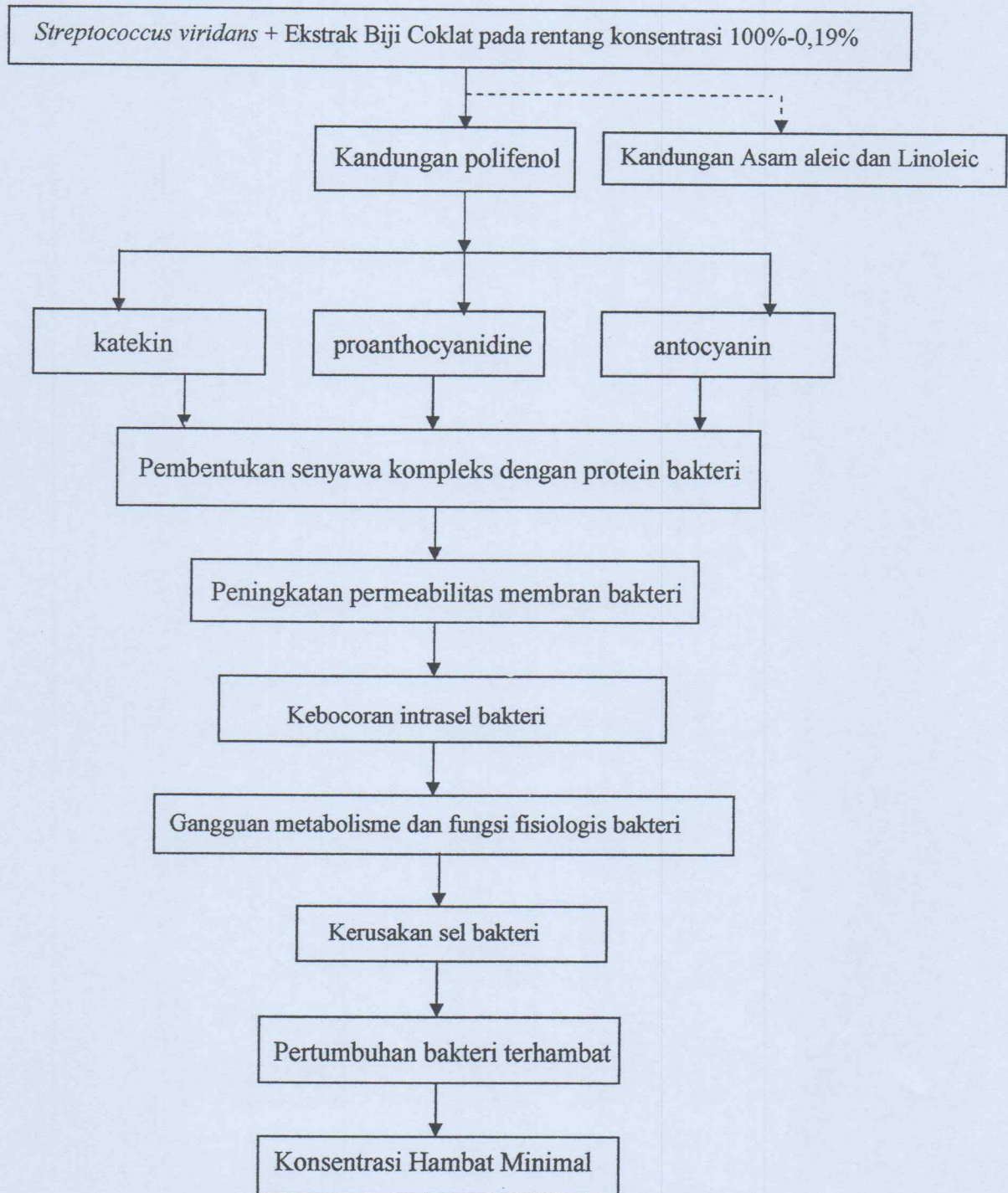
Metode ini membutuhkan larutan antibakteri yang telah diencerkan secara seri, yaitu dengan mengencerkan bahan antibakteri dengan media cair sehingga didapatkan larutan dengan kadar berkelipatan setengah (100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,13%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19%). Selanjutnya pada setiap tabung dimasukkan 0,1 ml atau 1 ml *inokulum* standart. Dua tabung dipakai sebagai kontrol positif dan kontrol negatif, sebagai kontrol positif diisi media dan *inokulum* sedangkan kontrol negatif tabung diisi media tanpa *inokulum*. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan diamati kekeruhan pada masing-masing tabung. Tabung yang jernih menunjukkan adanya hambatan pertumbuhan bakteri. Semakin kecil kadar bahan antibakteri yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan bakteri semakin besar aktifitas antibakterinya. Untuk lebih memperjelas hasil yang didapat dari tiap tabung ditanam ulang pada media agar, akan terlihat pertumbuhan koloni-koloni bakteri (cross check). Dengan metode ini dapat ditetapkan MIC (Minimum Inhibitory Concentration) dan MBC (Minimum Bactericidal Concentration).

- Metode difusi

Metode ini dipakai untuk menguji beberapa bahan antibakteri terhadap suatu bakteri. Media padat diinokulasi dengan bakteri uji, pada media tersebut dibuat sumuran dan bahan antibakteri yang akan diuji ditempatkan pada sumuran yang telah dibuat kemudian diinkubasi lalu diamati adanya daerah hambatan di sekeliling tempat diletakkannya antibakteri.

**BAB III**  
**KERANGKA KONSEPTUAL DAN**  
**HIPOTESIS PENELITIAN**

3.1. Kerangka konsep penelitian



Coklat memiliki kandungan *polyphenol* yang memiliki efek biologis, seperti anti inflamasi, menghambat bakteri dalam mulut, dan mampu menetralkan asam dalam mulut (Smullen et al, 2006; Trilaksana, 2009). *Polyphenol* yang terdapat pada biji coklat adalah *catekin*, *anthocanins*, dan *proanthocyanidine* (Rusconi et al, 2010). *Polyphenol* mempunyai sifat desinfektan, antiseptik, bakteristatik, dan bakterisid karena mempunyai kemampuan merusak membran sel bakteri. *Polyphenol* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus viridans* dengan cara merusak membran sel bakteri (lipid bilayer) sehingga menyebabkan tegangan permukaan dinding sel bakteri menurun dan permeabilitas dari membran sel meningkat, sehingga tekanan di dalam membran sel meningkat, hal inilah yang menyebabkan daya antibakteri *polyphenol* lebih efektif terhadap gram positif daripada bakteri gram negatif (Yamazaki et al, 2003). Selain menyebabkan rusaknya membran sel bakteri, terbentuknya senyawa kompleks menyebabkan terganggunya struktur tersier protein, sehingga protein tidak dapat berfungsi lagi, maka terjadi denaturasi pada protein dan asam nukleat. Denaturasi molekul-molekul protein dan asam nukleat menyebabkan koagulasi atau pembekuan protein sehingga akan menyebabkan gangguan metabolisme dan fungsi fisiologis dari bakteri. Apabila metabolisme terganggu atau tidak terjadi metabolisme maka kebutuhan energi tidak tercukupi dan mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan bakteri (Trilaksana, 2009).

### 3.2. Hipotesis Penelitian

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

- Ekstrak biji coklat sebagai antibakteri, dengan konsentrasi tertentu dapat menghambat pertumbuhan *Streptococcus viridans*.

**BAB IV**  
**METODE PENELITIAN**

**4.1. Jens Penelitian**

Eksperimental Laboratoris dengan rancangan penelitian *The Post Test Only Control Group Design*

**4.2. Populasi Penelitian**

Bakteri *Streptococcus viridans* yang berasal dari stok laboratorium Biologi Oral Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga

**4.3 Sampel Penelitian**

*Streptococcus viridans* yang diambil dari stok dengan cara membuat suspensi koloni *Streptococcus viridans* dengan media *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) dalam tabung reaksi.

**4.3.1 Teknik Pengambilan Sampel**

Simple random sampling

**4.3.2 Besar Sampel**

Besar sampel ditentukan dengan menggunakan rumus Lemeshow (1990):

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

Keterangan :

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

$n$  = Nilai besar sampel

$\tau$  = Standar deviasi

$Z_{1-1/2\alpha}$  = Nilai standar normal untuk  $1/2\alpha = 1,96$

$Z_{1-\beta}$  = Nilai standar normal untuk  $\beta = 0,84$

$\mu_1$  = Mean 1= Rata-rata hitung respons kelompok 1

$\mu_2$  = Mean 2= Rata-rata hitung respons kelompok 2

#### 4.4. Variabel Penelitian

Variabel bebas :

Ekstrak biji coklat (*Theobroma cacao*) jenis *Criollo* dalam berbagai konsentrasi

Variabel terkendali :

volume BHIB yang dipakai yaitu 5cc, sterilisasi alat dengan *autoclave*, cara penyimpanan dalam inkubator 37°C selama 24 jam, cara pembuatan ekstrak biji coklat, media perbenihan, dan suhu

Variabel terikat :

Jumlah koloni bakteri *Streptococcus viridans* yang tumbuh pada media *blood agar*.

#### 4.5. Definisi Operasional

a. Ekstrak biji coklat adalah bentuk sediaan yang diperoleh dari biji coklat jenis *Criollo* sejumlah 100gr dimaserasi dengan etanol 96% sebanyak 1,5



It lalu disaring dan etanol diuapkan menggunakan rotary evaporator suhu 40°C.

b. *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) / Konsentrasi hambat minimal ekstrak biji coklat adalah konsentrasi terendah dari bahan ekstrak biji coklat yang masih dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus viridians*, dapat ditentukan dengan melakukan pengamatan terhadap kekeruhan dengan perbandingan menggunakan standart 0,5 Mc Farland ( $1,5 \times 10^8$  sel/ml) pada tabung reaksi.

c. Jumlah koloni *Streptococcus viridans* adalah hasil perhitungan jumlah koloni *Streptococcus viridans* ditunjukkan dengan *Colony Forming Unit* (CFU) pada *cross check* di media *blood agar*.

#### 4.6. Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan adalah :

1. *petridish*
2. tabung reaksi dan rak tabung reaksi
3. mikropipet
4. *osse*
5. *spreader*
6. spidol
7. spiritus brander dan korek api
8. inkubator
9. gelas ukur
10. timbangan

11. rotary evaporator

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

12. *autoclave*

13. corong *buchner*

14. Lumpang dan alu

15. Tabung *erlenmeyer*

Bahan yang digunakan :

1. Biji coklat
2. *Aquadest* steril
3. *Ethanol* 96%
4. *Streptococcus viridans* (stok)
5. Media BHIB
6. Media *Blood agar*

#### **4.7. Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga dan Laboratorium Biologi Oral Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

#### **4.8. Cara Kerja**

##### **4.8.1. Sterilisasi Alat dan bahan yang akan digunakan**

Semua alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian disterilkan dalam autoclave dengan suhu 121°C selama 15 menit

#### 4.8.2. Pembuatan ekstrak biji coklat

Ekstrak biji coklat dibuat dari biji coklat sejumlah 250 gr yang dimaserasi dengan etanol dalam bejana tertutup selama 3x24 jam. Ekstrak kemudian disaring dengan corong *Buchner*. Hasil saringan didapat ekstrak cair yang kemudian diuapkan sampai bebas dari pelarut etanol dengan menggunakan *Rotary Vacuum Evaporator* pada suhu 40°C selama tiga jam sampai didapatkan ekstrak murni. Ekstrak murni disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit (Trilaksana, 2009).

#### 4.8.3. Persiapan kultur *Streptococcus viridans*

Penggunaan stok *Streptococcus viridans* dalam penelitian ini adalah dengan cara membuat suspensi koloni *Streptococcus viridans* dengan media *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) dalam tabung reaksi. Stok *Streptococcus viridans* diambil 1 koloni dari media *chocolate agar*. Stok diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, kemudian diencerkan dengan garam faali (NaCl 0,85%). Kekeruhan bakteri *Streptococcus viridans* disamakan dengan standard 0,5 *Mc Farland* ( $1,5 \times 10^8$  sel/ml) untuk memperoleh bakteri dengan konsentrasi tertentu (Baron, et al, 1994). Menyamakan kekeruhan suspensi bakteri dengan cara *double blind* (sebanyak 3 orang, dengan masing-masing melakukan tiga kali pengamatan) dilakukan dengan memegang tabung reaksi bersebelahan dan memandangnya pada latar belakang putih bergaris hitam. Jika kekeruhan suspensi bakteri masih belum sama, suspensi bakteri dapat diencerkan atau

diberi tambahan bakteri. Setelah didapatkan kekeruhan yang sama dengan standard tersebut, suspensi standard tersebut diencerkan.

#### 4.8.4. Penentuan Konsentrasi Hambat Minimal Ekstrak Biji Coklat terhadap *Streptococcus viridans* dilakukan dengan metode penipisan seri.

Penentuan konsentrasi hambat minimal bahan ekstrak biji coklat terhadap *Streptococcus viridans* dilakukan dengan metode penipisan seri (Trilaksana, 2009).

- a. Disediakan tabung steril, ditandai no.1 sampai no.12
- b. Diisi media BHIB sebanyak 5 ml pada masing-masing tabung no.2 sampai dengan tabung no.10
- c. Pada tabung no.1 dimasukkan ekstrak biji coklat konsentrasi 100% sebanyak 5 ml
- d. Ambil 5 ml dari tabung no.1 dimasukkan dalam tabung no.2. Volume tabung no.2 menjadi 10 ml dan penipisannya adalah  $5/10=1/2=50\%$ .
- e. Selanjutnya dari tabung no.2 diambil 5 ml dan dimasukkan dalam tabung no.3 sehingga penipisannya  $1/4=25\%$ . Dengan cara yang sama dilakukan sampai tabung no.10.
- f. Tabung no.11 sebagai kontrol positif (media BHIB dan bakteri *Streptococcus viridans*) dan tabung no.12 sebagai kontrol negatif hanya berisi media BHIB.
- g. Setelah seri penipisan selesai, dimasukkan 0,1 ml inokulum *Streptococcus viridans* pada tabung no.1 sampai tabung no.11.
- h. Diinkubasi selama 24 jam dalam suhu 37°C.

- i. Cara pembacaan hasil penipisan seri dari bahan terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus viridans*, yaitu dengan pengamatan secara visual ada tidaknya pertumbuhan yang ditandai dengan kekeruhan atau endapan dan ditentukan konsentrasi hambat minimal.
- j. Tiap tabung diambil 1 osse dan ditanamkan pada media *blood agar*.
- k. Seluruh *petridish* dimasukkan dalam anaerobic jar dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
- l. Koloni bakteri *Streptococcus viridans* yang tumbuh pada media *blood agar* dilihat secara manual dan dilakukan pengamatan terhadap pertumbuhan *Streptococcus viridans* kemudian ditentukan konsentrasi hambat minimal dengan cara dibuat garis kotak-kotak pada bagian belakang *petridish* dan dinyatakan dalam *Colony Forming Unit* (CFU). Pengamatan dilakukan oleh 3 orang pengamat, masing-masing pengamat melakukan tiga kali pengamatan.

#### 4.9. Uji Statistik

Pengolahan data menggunakan analisis statistik

- a. uji normalitas menggunakan tes *Kolmogorov Smirnov* untuk melihat apakah data yang didapat berdistribusi normal
- b. uji parametrik menggunakan tes *One Way Anova* untuk melihat signifikansi perbedaan jumlah koloni bakteri pada perbandingan antar kelompok penelitian

#### 4.10. Alur Penelitian

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Uji sensitivitas ekstrak biji coklat dengan metode penipisan seri

Tabung	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Penipisan (%)	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,19	Kontrol +	Kontrol -
	Ditambahkan <i>S. viridans</i>										<i>S. viridans</i> Tanpa bahan uji	BHIB Tanpa <i>S. viridans</i>

Inkubasi 37°C 24 jam

Pengamatan pada tabung secara visual ada atau tidak adanya kekeruhan atau endapan

Tanam pada media *blood agar* untuk cross check

Inkubasi 37°C 24 jam

Penghitungan koloni *S. viridans* (dalam CFU) dengan *Colony Counting*

MIC (Konsentrasi Hambat Minimal)

**BAB V**  
**HASIL PENELITIAN DAN ANALISA**  
**DATA**

**BAB V**  
 IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
**HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA**

Penentuan konsentrasi hambat minimal ekstrak biji coklat dilakukan dengan metode penipisan seri. Setelah dilakukan penelitian diperoleh hasil sebagai berikut:

Tabel 5.1. Hasil Pengamatan Pengenceran Seri

Sampel	Konsentrasi Ekstrak Biji Coklat(%)										Kontrol	
	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,19	(+)	(-)
1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
3	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
4	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
5	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
6	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
7	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-

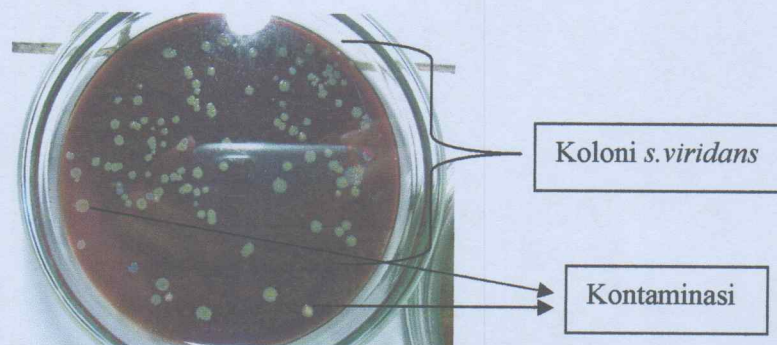
Keterangan:

- : tidak terdapat kekeruhan atau endapan pada tabung reaksi
- + : terdapat kekeruhan atau endapan pada tabung reaksi

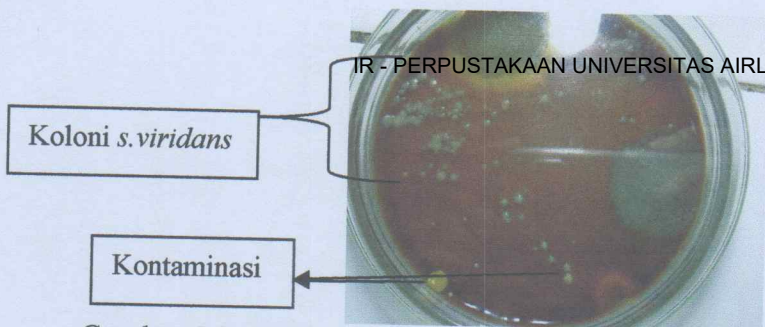
Pada table 5.1 terlihat bahwa pada tabung reaksi dengan konsentrasi 3,13% tidak menunjukkan adanya kekeruhan dan endapan. Tidak adanya kekeruhan dan endapan pada tabung reaksi menunjukkan ekstrak biji coklat dapat menghambat pertumbuhan *Streptococcus viridans* pada konsentrasi 3,13%. Hal ini berarti bahwa konsentrasi hambat minimal (KHM) ekstrak biji coklat terhadap pertumbuhan *Streptococcus viridians* terdapat pada konsentrasi 3,13%.



pertumbuhan bakteri. Untuk memastikan bahwa kekeruhan yang ada pada tabung reaksi adalah berasal dari bakteri *Streptococcus viridans* yang tidak berhasil dihambat oleh ekstrak biji coklat, maka dilakukan penanaman pada media Blood agar dari masing masing tabung. Media agar pada konsentrasi terakhir yang menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri menunjukkan bahwa pada konsentrasi tersebut bahan antibakteri bersifat bakteriostatik. Konsentrasi bahan antibakteri terendah yang pada kultur yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan mikroorganisme merupakan KBM. Dari hasil *crosscheck* , pada konsentrasi 6,25% (Gambar 5.4.) tidak terdapat pertumbuhan bakteri. Pada konsentrasi 3,13% (Gambar 5.3.) dan 1,56% (Gambar 5.2.) terdapat pertumbuhan bakteri. Hasil tersebut menunjukkan bahwa Konsentrasi Hambat Minimal ekstrak biji coklat terhadap *Streptococcus viridans* adalah 3,13%. Kekurangan dari metode *broth dilution* adalah hanya dapat melakukan uji untuk satu jenis mikroorganisme, kontaminasi *broth* sulit dideteksi, dan memerlukan biaya yang besar (Bauman et al., 2005; Boyd, 1995).



Gambar 5.1. Hasil penanaman kontrol positif pada media *blood agar*. Koloni *S. viridans* berwarna hijau, sedangkan kontaminasi bakteri lain berwarna putih.



Gambar 5.2. Hasil penanaman konsentrasi 1,56% pada media *blood agar*. Koloni *S. viridans* berwarna hijau, sedangkan kontaminasi bakteri lain berwarna putih dan putih kekuningan.



Gambar 5.3. Hasil penanaman konsentrasi 3,13% pada media *blood agar*. Koloni *S. viridans* berwarna hijau, sedangkan kontaminasi bakteri lain berwarna putih.



Gambar 5.4. Hasil penanaman konsentrasi 6,25% pada media *blood agar*. Tidak menunjukkan adanya kolonisasi bakteri.

Pada hasil *crosscheck*, dilakukan penghitungan koloni bakteri untuk melihat adanya pengurangan jumlah koloni bakteri pada tiap konsentrasi. Hasil penghitungan koloni tercantum dalam tabel berikut ini:

Tabel 5.2. Rata-rata dan Standar Deviasi Hasil Penghitungan Koloni

Kelompok	IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA		
	N	x	sd
Kontrol +	7	268	11,10
1,56%	7	151,71	22,70
3,13%	7	19,71	5,08
6,25%	7	0	0

Keterangan:

- x : Rata-rata jumlah koloni *Streptococcus viridans* pada media *Blood Agar*  
 SD : Standar Deviasi  
 N : Jumlah Sampel

Sebelum dilakukan uji beda antar kelompok penghitungan jumlah koloni *Streptococcus viridans*, dilakukan uji distribusi data dengan menggunakan uji statistik *Kolmogorov Smirnov Test* dan homogenitas variansnya dengan uji statistik *Levene's Test* namun pada kelompok konsentrasi 6,25% tidak dapat dilakukan analisa data, karena pada konsentrasi 6,25% sudah tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri sehingga tidak didapatkan variasi nilai pengukuran yang dapat diuji. Hasil kedua uji dapat dilihat pada tabel 5.3.

Tabel 5.3 Nilai p hasil uji *Kolmogorov Smirnov Test* dan *Levene's Test* pada kelompok penghitungan jumlah koloni *Streptococcus viridans*.

Kelompok	<i>Kolmogorov Smirnov Test</i>	<i>Levene's Test</i>
Kontrol +	p = 0,617	0,053
1,56%	p = 0,191	
3,13%	p = 0,858	
6,25%	-	-

Dari tabel 5.3 diketahui bahwa hasil uji distribusi data pada kelompok kontrol +, kelompok konsentrasi 1,56%, dan kelompok 3,13% mempunyai nilai

p>0,05. Hal ini menunjukkan bahwa semua kelompok perlakuan mempunyai distribusi data yang normal. Sedangkan hasil uji homogenitas varians dengan menggunakan uji statistik *Levene's Test* mempunyai nilai  $p = 0,053$  ( $p>0,05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa hasil pengukuran koloni *Streptococcus viridans* pada kelompok perlakuan mempunyai variansi data yang homogen.

Untuk mengetahui perbedaan jumlah koloni *Streptococcus viridans* antar kelompok penghitungan, dilakukan uji *One Way Anova*, karena pada kelompok sampel memiliki distribusi data yang normal dan varians data yang homogen. Hasil Uji *One Way Anova* terhadap Hasil Penghitungan Koloni *Streptococcus viridians* antar kelompok penghitungan menunjukkan bahwa ada perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan ( $p<0,05$ ).

Hasil *Post Hoc Test*, uji perbedaan antara semua kelompok penghitungan jumlah koloni *Streptococcus viridians* secara keseluruhan mempunyai nilai  $p<0,05$ . Hal ini menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna jumlah koloni *Streptococcus viridians* pada kelompok penghitungan tersebut.

**BAB VI**  
**PEMBAHASAN**

Penelitian konsentrasi hambat ekstrak biji coklat (*Theobroma cacao*) jenis (cultivar) criollo terhadap *Streptococcus viridians* dilakukan secara in vitro dengan menggunakan metode dilusi. Penelitian konsentrasi hambat ekstrak biji coklat dilakukan terhadap *Streptococcus viridians* karena bakteri ini merupakan salah satu mikroorganisme yang sering menimbulkan kerusakan pada pulpa (Ingle dan Bakland, 2002; Prasasti, 2009). Mikroorganisme dan produknya merupakan penyebab utama kelainan pulpa dan periapikal. Sebagian besar penyebab infeksi pulpa dan infeksi jaringan periapikal adalah fakultatif anaerob dan obligate anaerob. Tronstad (2003) menyatakan pada lesi periapikal, banyak ditemukan bakteri gram positif, frekuensi bakteri tersebut mencapai 60-80% pada daerah tersebut, yang terbanyak adalah golongan *Streptococcus viridians*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa daya hambat ekstrak biji coklat terhadap pertumbuhan *Streptococcus viridians* mulai terlihat pada konsentrasi 3,13%, yang tidak memperlihatkan adanya kekeruhan atau endapan pada tabung reaksi, namun masih terlihat adanya pertumbuhan pada media agar. Pada metode dilusi, konsentrasi KHM tidak menunjukkan adanya kekeruhan, karena proses pembentukan koloni terhambat, dan pertumbuhan bakteri juga terhambat oleh *polyphenol* pada ekstrak biji coklat. Hasil *crosscheck* pada konsentrasi 6,25% tidak terdapat pertumbuhan bakteri, tetapi pada konsentrasi 3,13% dan 1,56% terdapat pertumbuhan bakteri. Pada konsentrasi KHM pada konsentrasi 3,13% menunjukkan adanya koloni pada media agar, hal tersebut membuktikan bakteri

tidak semuanya mengalami mati, namun hanya terhambat pertumbuhan dan proses pembentukan koloninya. Chusnie dan Lamb (2005) menyatakan bahwa pada dilusi, koloni tidak mengalami kematian, namun mengalami penurunan jumlah koloni karena terhambatnya proses terbentuknya koloni oleh flavonoid, namun bakteri tetap ada, sehingga pada media agar yang tidak diberi bahan antibakteri, bakteri tetap tumbuh karena tidak terdapat bahan antibakteri yang menghambat pertumbuhan bakteri tersebut. Pada konsentrasi KHM, bakteri akan terhambat pertumbuhannya, namun jika paparan dihentikan, akan terdapat kemungkinan terjadi pertumbuhan bakteri, namun pada konsentrasi KBM, bakteri mengalami kematian, sehingga pada media agar pun tidak akan terlihat adanya pertumbuhan bakteri tersebut, hal tersebut yang membedakan konsentrasi KHM dan KBM.

Dari hasil penghitungan jumlah koloni *Streptococcus viridians* dalam media *blood agar* menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak biji coklat yang diaplikasikan, jumlah koloni *Streptococcus viridians* semakin menurun. Berdasarkan analisa statistik dengan *one way anova*, didapatkan hasil uji perbedaan antara semua kelompok penghitungan jumlah koloni *Streptococcus viridians* secara keseluruhan mempunyai nilai  $p < 0,05$ . Hal ini menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna jumlah koloni *Streptococcus viridians* pada kelompok penghitungan tersebut. Hal ini disebabkan semakin tinggi konsentrasi ekstrak biji coklat maka bahan aktif *polyphenol* yang terkandung di dalamnya juga lebih tinggi, sehingga aktivitas menghambat *Glukosil transferase* dari *Streptococcus viridians* akan lebih tinggi.

Dalam penelitian ini pertumbuhan *Streptococcus viridians* dapat dihambat oleh ekstrak biji coklat disebabkan oleh kandungan senyawa kimia yang terkandung di dalamnya. Polyphenol merupakan salah satu senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak biji coklat yang memiliki efek biologis, salah satunya aktivitas menghambat *glukosail transferase* dari *Streptococcus viridians*. Tiga golongan *polyphenol* yang dapat dibedakan adalah *catechin* (flavan-3-ol), *anthocyanin*, *proanthocyanidin*. katekin yang utama adalah epikatekin yang memiliki *polyphenol* hingga 37%. Tidak semua produk alami menunjukkan aktivitas serupa, hal itu juga tergantung pada efektivitas dan stabilitas produk tersebut. Aktivitas bakterisidal pada *Streptococcus viridians* juga dimiliki asam *oleic* dan *linoleic* yang terkandung dalam biji coklat (Srikanth et al, 2008).

Mekanisme kerja *polyphenol* sebagai antibakteri adalah dengan cara merusak membran sel bakteri (lipid bilayer) sehingga menyebabkan tegangan permukaan dinding sel bakteri menurun dan permeabilitas dari membran sel meningkat, sehingga tekanan di dalam membran sel meningkat, hal inilah yang menyebabkan daya antibakteri *polyphenol* lebih efektif terhadap gram positif daripada bakteri gram negatif (Yamazaki et al, 2003). Selain menyebabkan rusaknya membran sel bakteri, terbentuknya senyawa kompleks menyebabkan terganggunya struktur tersier protein, sehingga protein tidak dapat berfungsi lagi, maka terjadi denaturasi pada protein dan asam nukleat. Denaturasi molekul-molekul protein dan asam nukleat menyebabkan koagulasi atau pembekuan protein sehingga akan menyebabkan gangguan metabolisme dan fungsi fisiologis dari bakteri. Apabila metabolisme terganggu atau tidak terjadi metabolisme maka



kebutuhan energi tidak tercukupi dan mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan bakteri (Trilaksana, 2009).  
IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Uraian di atas sesuai dengan hipotesis yang diajukan bahwa ekstrak biji coklat memiliki daya antibakteri terhadap pertumbuhan *Streptococcus viridians*, dengan konsentrasi hambat minimal ekstrak biji coklat terhadap *Streptococcus viridians* sebesar 3,13%. Untuk dapat digunakan sebagai suatu bahan irigasi saluran akar, selain bersifat antibakteri, suatu larutan irigasi saluran akar yang baik harus mampu melarutkan kotoran organik dan anorganik, melumasi alat endodontik, tidak toksik, dan ekonomis (Yanti, 2000; Tronstad, 2003). Larutan irigasi yang paling baik adalah mempunyai daya antimikroba yang maksimal dengan toksisitas yang minimal dan memenuhi syarat-syarat biokompatibilitas (dapat diterima oleh jaringan tubuh) yaitu tidak membahayakan pulpa dan jaringan lunak, tidak mengandung substansi yang bisa menyebabkan respon sistemik bila berdifusi dan diadsorpsi ke dalam sistem sirkulasi, dan bebas dari agen sensitisasi yang dapat menyebabkan respon alergi serta tidak berpotensi karsinogenik (Yanti, 2000). Berdasarkan uraian tersebut, maka masih diperlukan pengkajian dan penelitian-penelitian lebih lanjut yang dapat mendukung penggunaan ekstrak biji coklat sebagai alternatif bahan irigasi saluran akar.

**BAB VII**  
**KESIMPULAN DAN SARAN**

### 7.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa konsentrasi hambat minimal ekstrak biji coklat terhadap *Streptococcus viridans* adalah 3,13%.

### 7.2. Saran

Perlu dilakukan penipisan rentang konsentrasi ekstrak biji coklat sebagai antibakteri terhadap *Streptococcus viridans* serta diperlukan pengkajian dan penelitian lebih lanjut tentang sifat toksisitas dan biokompatibilitas ekstrak biji coklat sebagai alternatif bahan irigasi saluran akar.

# DAFTAR PUSTAKA

- Agustin, E.T., 2007, 'Daya Antibakteri Ekstrak Buah Makutadewa (*Phaleria Macrocarpa* (Scheff) Boerl)' Terhadap Bakteri *Streptococcus alpha haemolyticus*, Skripsi FKG Universitas Airlangga, Surabaya, pp 37-38.
- Baron E.J., Finegold S.M. 1994. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*. 9<sup>th</sup> ed. St. Louis, MO: The C.V Mosby Company, pp. 171-193
- Brooks, G F, et al. 2007. *Jawetz, Melnick, and Adelberg's Medical Microbiology*. 24<sup>th</sup> ed. New York: Mc Graw hill Comp.p233, 239-241.
- Chusnie, T.P.T. dan Lamb, A.J. 2005. Antimicrobial Activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Vol 26. P.343-356
- Fessi, R.A. 2009. Daya Hambat Minimum Ekstrak Daun Jambu Biji (*psidium guajava linn*) terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans*. Skripsi FKG Universitas Airlangga. P. 5-12
- Forbes, A Berty, et al. 2007. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. 12<sup>th</sup> ed. St Louis: Mosby. p270.

- Ingle J.I. dan Bakland L.K, (2002) : *Endodontics*. 5<sup>th</sup> ed. BC Decker Inc. London. p 67-69  
IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
- Ito et al, (2003) : *Anticariogenic Properties of a Water Soluble Extract from Cacao*, Biosci. Biotechnol. Biochem., 67(12), p 2567-2573
- J.R Farida, Dewa Ayu citra. 2010. 'Manfaat Sirih Merah Sebagai Agen Anti Bakterial Terhadap Bakteri Gram Positif dan Negatif'. J.Ked dan Kesehatan Indonesia. p1-9.
- Katzung, B.G. 2001. 'Basic and Clinical Pharmacology. Farmakologi Dasar dan Klinik'. Alih bahasa: Setio Harsono. Jakarta: Salemba Medika. p3-16.
- Kim et al, (2000) : *manufacturing Process of Glucosyltransferase inhibitors from cacao bean husk*, USP p 1-3 downloaded on <http://www.patentstorm.us> accessed at 1<sup>st</sup> April 2010.
- Lemeshow S., D.W. Hosmer Jr, J. Klar & S.K. Lwanga, 1990, 'Adequacy of Sample Size in Health Studies', WHO, John Wiley & Sons.
- Nugrohowati, P.B., (2005) : *Penentuan Kadar Hambat Minimal Rebusan Daun Sirih terhadap streptococcus mutans dan hasil kebersihan dinding saluran akar*, Karya Tulis Ilmiah Akhir, FKGUNAIR, p 3

- Okoro, I.O., Osagie, A., Asibor, E.O., 2009, 'Antioxidant and antimicrobial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Nigeria', African Journal of Biotechnology, Vol. 9. no. 20, pp. 2989-2993.
- Patra, A.K., dan Jyotisna S., 2009, 'Dietary Phytochemicals as Rumen Modifiers: a Review of the Effects on Microbial Populations', Antonie van Leeuwenhoek, Vol 96, pp. 363-375.
- Patil, R., Makari, H. K., Gurumurthy, H., 2007, 'In Vitro Antimicrobial Activity Of Ethanol Extract of Thevetia Peruviana', EJEAFChe, Vol. 6. No. 9, pp 2318-2322.
- Prasasti, B.S., (2009) : *Pengaruh konsentrasi ekstrak Jinten Hitam (Nigella Sativa) terhadap pertumbuhan fusobacterium nucleatum*. Skripsi Program Sarjana FKG UNAIR. p. 5-15.
- Revoua, Y, (2005) : *A Study of Streptococcus Viridans In The Maxillofacial Region*. Journal of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. 2(4). p. 174-177
- Rusconi, M. dan Conti A. (2010) : *Theobroma cacao L., the food of the Gods: a Scientific approach beyond myths and claims*. Journal of Pharmacological Research. 61. p. 5-13.

- Sanjaya, Hellen., (2007) : *Khasiat antibakteri bahan irigasi infusum daun sirih 2% (piper betle linn), sodium hipoklorit 2,5% dan hidrogen peroksida 3% terhadap streptococcus viridans*, Skripsi Program Sarjana FKGUNAIR, p 1-5
- Smullen et al. (2007) : *The Antibacterial Activity of Plant Extracts Containing Polyphenols against Streptococcus mutans*. Caries Research 41. P. 342-349
- Srikanth et al (2008) : *Chocolate mouth rinse: Effect on plaque accumulation and mutans streptococci counts when used by children*, JISPPD, p 67-70, downloaded on <http://www.jisppd.com> accessed at 29 Maret 2010.
- Tanu, Ian, 'Farmakologi dan Terapi', Edisi 5, 2007, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, pp. 585-587.
- Taufik, Muhammad., et al, (2007) : *Karakterisasi Sifat-sifat Morfologi, Fisiologi dan Biokimia tanaman kakao (Theobroma cacao L.) Berproduksi Tinggi*. Jurnal Akta Agrosia. 10(2). p. 150-155.
- Topazian, R.G. et al (2002) : *Oral and Maxillofacial Infections*, 4<sup>th</sup> ed, WB Saunders Company, Philadelphia, p 32-34, 148-150



- Trilaksana, A.C. (2009) : *Daya Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Kakao Terhadap Pertumbuhan Streptococcus mutans*. Karya Tulis Akhir Program Pendidikan Dokter Gigi Spesialis Ilmu Konservasi Gigi Universitas Airlangga. p 2-13; 33-43
- Tronstad L., (2003) : *Clinical Endodontics*. 2<sup>nd</sup> ed. Thieme Stuttgart. New York. p 84-139.
- White, R.R. and Kolstad, R., 1999, 'Desinfection and Sterilisation, Essential Dental Microbiology', Prentice Hall International Inc, p 55
- Wulandari, Erawati, (2000) : *Khasiat antibakteri bahan irigasi asam sitrat 6% dan khlorheksidin glukonat 0,2% terhadap streptococcus viridans*, Dental Journal FKG UNAIR, 240, p 4
- Yamazaki, et al. (2003) : *In vitro Inhibitory Effects of Tea Polyphenols on the Proliferation of Chlamydia trachomatis and Chlamydia pneumoniae*. Jpn. J. Dis. vol 56. p 143-145.
- Yanti, Nevi. (2000) : *Biokompatibilitas Larutan Irigasi Saluran Akar*, Dentika Journal FKG USU., 5(1), p 1-2

# LAMPIRAN

# LAMPIRAN

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

## Hasil Pengamatan Visual Kekeruhan Pada Metode Dilusi

Sampel	Konsentrasi Ekstrak Biji Coklat(%)										Kontrol	
	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,19	(+)	(-)
1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
3	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
4	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
5	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
6	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
7	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-

## Penghitungan koloni pada konsentrasi 6,25%

Sampel	Jumlah Koloni
1	0
2	0
3	0
4	0
5	0
6	0
7	0

### Penghitungan koloni pada konsentrasi 3,13%

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Sampel	Jumlah Koloni
1	24
2	16
3	11
4	25
5	24
6	19
7	19

### Penghitungan koloni pada konsentrasi 1,56%

Sampel	Jumlah Koloni
1	179
2	145
3	151
4	111
5	176
6	155
7	145

### Penghitungan koloni pada control +

Sampel	Jumlah Koloni
1	285
2	261
3	256
4	265
5	266
6	261
7	282

### Test Distribusi Normal Konsentrasi 3.13 %

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		juml.koloni
N		7
Normal Parameters(a,b)	Mean	19.7143
	Std. Deviation	5.08967
Most Extreme Differences	Absolute	.229
	Positive	.150
	Negative	-.229
Kolmogorov-Smirnov Z		.605
Asymp. Sig. (2-tailed)		.858
a Test distribution is Normal.		
b Calculated from data.		

### Test Distribusi Normal Konsentrasi 1.56 %

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		juml.koloni
N		7
Normal Parameters(a,b)	Mean	137.4286
	Std. Deviation	57.45682
Most Extreme Differences	Absolute	.410
	Positive	.235
	Negative	-.410
Kolmogorov-Smirnov Z		1.084
Asymp. Sig. (2-tailed)		.191
a Test distribution is Normal.		
b Calculated from data.		

# Test Distribusi Normal Kontrol +

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		juml.koloni
N		7
Normal Parameters(a,b)	Mean	268.0000
	Std. Deviation	11.10555
Most Extreme Differences	Absolute	.286
	Positive	.286
	Negative	-.182
Kolmogorov-Smirnov Z		.756
Asymp. Sig. (2-tailed)		.617
a Test distribution is Normal.		
b Calculated from data.		

## Oneway Anova

### Test of Homogeneity of Variances juml.koloni

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.468	2	18	.053

### ANOVA juml.koloni

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	215953.143	2	107976.571	93.878	.000
Within Groups	20703.143	18	1150.175		
Total	236656.286	20			

**SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI****No. 1226 /IPH.UPT.03.4/HM/X /2010**

Kepala UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi dengan ini menerangkan bahwa material tanaman yang dibawa oleh :

**Nina Dhaniar, NIM : 020710016**

Mahasiswa Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, datang di UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi pada tanggal 2 September 2010 berdasarkan PROSEA (Plants Resources of South-East Asia) No 16; Stimulants, editor H.A.M. van der Vossen dan M. Wessel, tahun 2000, halaman 113 - 121, nama ilmiahnya adalah:

Marga : *Theobroma*  
Jenis : *Theobroma cacao* L.  
Kultivar : *Criollo*

Adapun menurut buku The Standard Cyclopedia of Horticulture, karangan L.H. Bailey, jilid I, tahun 1953, halaman 3, klasifikasinya adalah sebagai berikut:

Divisio : *Spermatophyta*  
Sub Divisio : *Angiospermae*  
Kelas : *Dicotyledoneae*  
Ordo / Bangsa : *Malvales*  
Family / Suku : *Sterculiaceae*

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Purwodadi, 21 Oktober 2010

An. Kepala

UPT Balai Konservasi Tumbuhan  
Kebun Raya Purwodadi  
Kepala Seksi Konservasi Ex-situ,

48



*Nina Dhaniar*

NINA DHANIAR