

Journal of Comprehensive Science
p-ISSN: 2962-4738 e-ISSN: 2962-4584
Vol. 3. No. 5, Mei 2024

**EFEK KITOSAN EKSTRAK KULIT UDANG GALAH TERHADAP
KEMAMPUAN PERLEKATAN STREPTOCOCCUS SANGUINIS ATCC 10556
PADA DISKUS HIDROKSIAPATIT IN VITRO**

Adhitya Sofiyati Dewi
Universitas Gadjah Mada, Indonesia
Email: adhityasdewi@gmail.com

Abstrak

Streptococcus sanguinis dikenal sebagai pelopor pembentukan plak gigi. Kemampuan *S. sanguinis* untuk menempel pada permukaan gigi berperan dalam proses karies dan dipengaruhi oleh adanya kepatuhan protein dan enzim glukosiltransferase yang dihasilkan oleh bakteri. Kitosan adalah polimer kationik yang menghambat kepatuhan dan kolonisasi bakteri dalam jaringan inang dengan menciptakan batas elektrostatis ke sisi negatif dari permukaan sel bakteri. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh kitosan dari ekstrak kulit udang terhadap kelekatan *S. sanguinis* ATCC 10556 terhadap hidroksiapatit cakram in vitro. Dua puluh empat cakram hidroksiapatit dilapisi dengan air liur kemudian dimasukkan ke dalam tabung dan dibagi menjadi empat kelompok di mana satu adalah kontrol negatif dan tiga lainnya adalah kelompok perlakuan. Kitosan dengan konsentrasi 1%, 0,5%, 0,25%, BHI dengan sukrosa 2%, dan suspensi bakteri *S. sanguinis* ditambahkan ke dalam tiga kelompok perlakuan yang berbeda sehingga konsentrasi akhir kitosan menjadi 0,4%, 0,2% dan 0,1%. Kontrol negatif mengandung BHI dengan sukrosa 2% dan suspensi bakteri *S. Sanguinis* tanpa kitosan. Semua cakram diinkubasi selama 24 jam kemudian direndam ke dalam media PBS. Sampel diencerkan hingga 10⁻³ dan dari pengenceran akhir media kultur disebarkan pada agar mitis salivarius. Setelah 48 jam inkubasi pada suhu 37° C, jumlah koloni dihitung. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan one way analysis of variance (ANOVA) dilanjutkan dengan uji LSD. Analisis statistik menunjukkan bahwa konsentrasi kitosan yang berbeda berpengaruh signifikan terhadap jumlah koloni *S. sanguinis* ATCC 10556 yang dipatuhi cakram hidroksiapatit ($P < 0,05$). Kesimpulan dari penelitian ini adalah kitosan dari ekstrak kulit udang menurunkan kelekatan *S. sanguinis* ATCC 10556 pada cakram hidroksiapatit. Kitosan dengan konsentrasi 0,4% terbukti menjadi konsentrasi yang efektif untuk menurunkan jumlah koloni *S. sanguinis* yang dipatuhi cakram hidroksiapatit.

Kata Kunci: *S. sanguinis* ATCC 10556, kitosan, cakram hidroksiapatit, kepatuhan.

Abstract

Streptococcus sanguinis is known as a pioneer of dental plaque formation. The ability of *S. sanguinis* to adhere to tooth surface plays a role in the process of caries and is affected by the presence of adherence protein and glucosyltransferase enzyme produced by the bacteria. Chitosan is a cationic polymer which inhibits the adherence and the colonization of the bacteria in the host tissue by creating electrostatic bounds to the

negative side of the bacterial cell surfaces. The aim of this study was to determine the effect of chitosan from shrimp shells extract to the adherence of S. sanguinis ATCC 10556 on hydroxyapatite disc in vitro. Twenty four hydroxyapatite discs were coated with saliva then put into tubes and divided into four groups in which one was the negative control and the other three were the treatment groups. Chitosan with the concentrations of 1%, 0.5%, 0.25%, BHI with 2% sucrose, and bacterial suspension of S. sanguinis was added into the three different treatment groups so the final concentration of chitosan became 0.4%, 0.2% and 0.1%. Negative control contained BHI with 2% sucrose and bacterial suspension of S. Sanguinis without chitosan. All of the discs were incubated for 24 hours then soaked into a medium of PBS. Samples were diluted up to 10⁻³ and from the final dilution the cultured medium was spread on mitis salivarius agar. After 48 hours incubation at 37° C, the number of colonies were counted. Data obtained were analyzed using the one way analysis of variance (ANOVA) followed by the LSD test. The statistical analysis showed that different concentrations of chitosan significantly influenced the number of S. sanguinis ATCC 10556 colony which were adhered on hydroxyapatite disc (P<0.05). The conclusion of this study was chitosan from shrimp shells extract decrease the adherence of S. sanguinis ATCC 10556 on hydroxyapatite disc. Chitosan with concentration 0.4% proved to be an effective concentration to decrease the number of S. sanguinis colony which were adhered on hydroxyapatite disc.

Keywords: s. sanguinis atcc 10556, chitosan, hydroxyapatite disc, adherence.

PENDAHULUAN

Salah satu masalah gigi dan mulut yang masih banyak dikeluhkan oleh anak-anak dan orang dewasa adalah masalah gigi berlubang atau karies gigi. Karies gigi merupakan proses pelarutan email (deminalisasi) yang disebabkan asam dari hasil pemecahan karbohidrat oleh bakteri yang melekat pada permukaan gigi (Heymann, Swift Jr, & Ritter, 2012). Indeks DMF-T di Indonesia menurut Riset Kesehatan Dasar tahun 2013 sebesar 4,5. Nilai indeks DMF-T tersebut menurut WHO termasuk kategori tinggi (Riskesdas, 2013).

Etiologi utama terbentuknya karies gigi adalah plak gigi (Raner dkk., 2014). Plak gigi merupakan deposit lunak, terdiri dari mikroorganisme yang berkembang di dalam suatu matriks ekstraseluler dan melekat pada permukaan gigi, jaringan di rongga mulut serta restorasi gigi (Dharmadhikari dkk., 2015). Pembentukan plak gigi diawali dengan melekatnya bakteri primer seperti Streptococcus sanguinis, S. oralis, S. mitis, S. gordonii dan A. naeslundii pada permukaan gigi melalui acquired pellicle (He et al., 2013). Acquired pellicle merupakan protein saliva yang membentuk lapisan tipis pada gigi beberapa detik setelah gigi dibersihkan (Newman dkk, 2002). Proses pembentukan plak terjadi ketika bakteri primer yang memiliki reseptor spesifik berikatan dengan protein saliva seperti proline-rich protein, statherin, alpha amylase, dan mucin glycoprotein pada permukaan gigi. Hasil aktivitas enzim glucosyltransferase bakteri primer yaitu glucan polysaccharides (GPS) juga turut melekat pada acquired pellicle dan menyediakan reseptor glucan-binding protein. Bakteri sekunder (S. mutans, S. sobrinus, dan Lactobacillus) selanjutnya berikatan secara langsung dan membentuk koagregasi dengan bakteri primer melalui protein saliva atau reseptor glucan-binding protein (Lamont dkk., 2014).

Perlekatan bakteri pada permukaan gigi diawali melalui perlekatan non spesifik yaitu gaya elektrostatis, gaya van der Waals, dan interaksi hidrofobitas. Gaya elektrostatis dapat menyebabkan reaksi tarik-menarik muatan positif protein spesifik bakteri dengan muatan negatif pada acquired pellicle (Kong, Chen, Xing, & Park, 2010). Gaya elektrostatis tersebut dapat diperkuat oleh sifat hidrofobik bakteri. Beberapa faktor yang mempengaruhi sifat hidrofobik bakteri adalah adanya fimbriae dan komponen ampifatik asam lipoteikoat pada dinding sel bakteri (Razak dkk., 2006). Sifat hidrofobik fimbriae ini meningkatkan afinitas bakteri pada reseptor sehingga terjadi pelekatan bakteri pada reseptor (Fardiaz, 2012). Ikatan

hidrogen dan divalen kation selanjutnya terjadi ketika bakteri sudah mendekati permukaan gigi sehingga interaksi menjadi stabil. Bakteri akhirnya membentuk perlekatan spesifik antara protein spesifik dan reseptor acquired pellicle dengan afinitas yang lebih kuat (Lamont dkk., 2014).

Streptococcus sanguinis merupakan flora normal yang terdapat dalam rongga mulut dan saluran napas atas (Ibrahim & Hameed, 2015). *Streptococcus sanguinis* adalah bakteri Gram positif, berbentuk kokus, dan bersifat fakultatif-anoerob (Chowdhury et al., 2014). Bakteri tersebut memiliki protein spesifik berupa pili A, B, dan C yang memungkinkan melekat pada permukaan gigi melalui acquired pellicle (Chowdhury dkk., 2014; Nobbs dkk., 2011). Pili tersebut mampu berikatan secara spesifik dengan alpha-amylase yang merupakan komponen acquired pellicle (Forssten, Björklund, & Ouwehand, 2010).

Streptococcus sanguinis menghasilkan enzim glucosyltransferase yang berperan dalam pembentukan glukon. Glukon membantu perlekatan *S. sanguinis* pada permukaan gigi melalui glukon-binding protein sehingga menyebabkan akumulasi *Streptococcus* kariogenik yang berhubungan dengan aktivitas pembentukan karies (Lamont dkk., 2014; Yoshida dkk., 2014; Koo dkk., 2002).

Plak gigi dapat dikurangi melalui mekanisme kontrol plak. Kontrol plak dapat dilakukan secara mekanis dan kimiawi. Kontrol plak secara mekanis dilakukan dengan menggunakan sikat gigi dan benang gigi sedangkan secara kimiawi dapat menggunakan obat kumur (Bhat, Prasad, Trivedi, & Acharya, 2014). Sikat gigi tidak dapat sepenuhnya membersihkan plak pada bagian gigi yang sulit dijangkau oleh bulu sikat, dapat menyebabkan resesi gingiva serta sulit diterapkan pada orang dengan cacat fisik dan mental (Magfirah, 2014; Bhat dkk., 2014). Maka dari itu penggunaan obat kumur menjadi pilihan untuk dapat mengurangi pembentukan plak (Bhat dkk., 2014).

Obat kumur yang beredar di pasaran memiliki beberapa efek samping. Obat kumur chlorhexidine memiliki efek bakterisidal karena mengandung bisbiguanide yang merupakan antibakteri spektrum luas. Penggunaan antibakteri spektrum luas dapat menyebabkan resistensi mikroba. Efek sekunder lainnya yang disebabkan oleh penggunaan obat kumur chlorhexidine 0,2 % antara lain: perubahan warna gigi dan lidah menjadi coklat, perubahan sensasi lidah, iritasi mukosa mulut, erosi mukosa mulut, meningkatkan pembentukan kalkulus supragingiva dan pembengkakan kelenjar parotid. Sementara itu, obat kumur Listerine mengandung fenol yang memiliki efek menghambat pembentukan plak tetapi menimbulkan sensasi terbakar dan timbulnya rasa pahit pada mulut (Costa, Silva, Pina, Tavarina, & Pintado, 2012). Pencarian alternatif alami untuk obat kumur yang ada menjadi sangat penting untuk dilakukan.

Udang galah (*Macrobrachium rosenbergii*) adalah salah satu species udang air tawar terbanyak di Indonesia. Udang galah merupakan udang yang paling populer dari keseluruhan udang air tawar karena ukuran tubuhnya yang besar dan memiliki nilai ekonomi yang tinggi baik di pasar domestik maupun luar negeri. Departemen Kelautan dan Perikanan (DKP) telah menetapkan udang galah sebagai salah satu alternatif komoditas unggulan pada tahun 2001 (Priyono dkk., 2011). Indonesia memperoleh 34% devisa sektor perikanan dari hasil ekspor udang sebesar 125.596 ton pada tahun 2007 (Swastawati dkk., 2008). Udang galah sendiri menunjukkan peningkatan produksi dan total produksi yang mencapai 95,5 ton di Daerah Istimewa Yogyakarta pada tahun 2012 (Putra, 2013). Banyaknya produksi udang ini akan menghasilkan limbah berupa hasil samping produksi seperti kepala, kulit, ekor dan kaki yang beratnya sekitar 35%-50% dari berat awal. Limbah yang dihasilkan dari proses pembekuan udang, pengalengan udang, dan pengolahan kerupuk udang berkisar antara 30% -75% dari berat udang. Hasil samping ini di Indonesia belum banyak digunakan sehingga hanya menjadi limbah yang mengganggu lingkungan, terutama bau yang tidak sedap dan pencemaran air (Swastawati dkk., 2008).

Kulit udang galah (*Macrobrachium rosenbergii*) mengandung kitin (Putra, 2013). Kitin banyak dimanfaatkan dalam bidang pangan, pertanian, industri, bioteknologi dan kedokteran. Kitin terdiri dari unit N-asetil glukosamin (2-asetamido-2-deoksi-d-glukosa) yang dihubungkan oleh ikatan β (1-4) (Costa dkk., 2014). Kitin tidak larut air tapi larut dalam asam seperti asam

asetat (Stamford dkk., 2013). Struktur kitin yang terdapat pada kulit udang adalah α - kitin. α - kitin memiliki struktur kristal yang lebih padat, kemurnian yang tinggi serta tidak adanya kalsit (Rinaudo, 2006). Deasetilasi parsial kitin akan membentuk kitosan (Costa dkk., 2014).

Kitosan banyak dikembangkan dalam bidang biomedika dan farmasetika karena sifatnya yang biocompatible, biodegradable, dan bioadhesif. Kitosan dapat berperan sebagai zat pembawa obat, membantu proses osteogenesis, mempercepat penyembuhan luka, dan menghambat pembentukan plak serta dekalsifikasi email (Stamford dkk., 2013). Kemampuan kitosan menghambat perlekatan bakteri terjadi melalui interaksi elektrostatis yaitu ketika kation NH_3^+ dari kitosan berikatan dengan muatan negatif kelompok fosfat pada dinding sel bakteri. Penelitian mengenai efek kitosan kepingan dan jamur terhadap perlekatan *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. mitis*, *S. oralis* terbukti dapat menghambat pembentukan koloni, menurunkan perlekatan *S. mutans* pada permukaan email, hidrofobisitas dinding bakteri dan produksi glukon oleh bakteri (Davassi, 2011).

Berdasarkan latar belakang masalah di atas dapat dirumuskan suatu permasalahan yaitu: Bagaimana efek kitosan ekstrak kulit udang galah terhadap perlekatan *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556 pada diskus hidroksiapatit in vitro? Costa dkk. (2013) menyatakan bahwa kitosan menunjukkan efek yang kuat dalam menghambat perlekatan dan pembentukan biofilm oleh *S. mutans*. Penelitian tersebut dilakukan pada aluminum disk yang direndam dengan kitosan. Hasil penelitian menunjukkan persentase penghambatan *S. mutans* oleh kitosan mencapai 91%. Tarsi dkk. (1997) menunjukkan bahwa konsentrasi sub-MIC kitosan mampu mengurangi perlekatan *S. mutans* pada hidroksiapatit hingga 66%. Sejauh penulis ketahui, penelitian mengenai pengaruh kitosan ekstrak kulit udang galah terhadap perlekatan bakteri *S. sanguinis* pada diskus hidroksiapatit in vitro belum pernah dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek kitosan ekstrak kulit udang galah terhadap perlekatan *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556 pada diskus hidroksiapatit in vitro.

METODE PENELITIAN

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental laboratorium. Identifikasi Variabel Penelitian yaitu Variabel Pengaruh Konsentrasi kitosan dari ekstrak udang galah dan Variabel Terpengaruh Jumlah koloni bakteri *S. sanguinis* ATCC 10556 yang melekat pada diskus hidroksiapatit. Variabel Terkendali :

- a. Konsentrasi suspensi bakteri : $1,5 \times 10^8$ CFU/ml
- b. Suhu inkubasi : 37°C
- c. Lama inkubasi : 24 jam
- d. Species udang galah : *Macrobrachium rosenbergii*
- e. Konsentrasi akhir kitosan : 0,4%, 0,2%, 0,1%
- f. Derajat keasaman (pH) kitosan : 6
- g. Diameter diskus hidroksiapatit : 10 mm
- h. Ketebalan diskus hidroksiapatit : 3 mm

Kitosan kulit udang galah merupakan serbuk turunan kitin kulit udang galah yang diperoleh melalui proses deproteinasi, demineralisasi, depigmentasi, dan deasetilasi. *Streptococcus sanguinis* merupakan bakteri *S. sanguinis* ATCC 10556 yang berbentuk kokus, tersusun rantai dan fakultatif anaerob. Koloni bakteri *S. sanguinis* ATCC 10556 yang tumbuh pada agar Mitis Salivarius adalah datar, berwarna biru tua, tepi halo-biru muda yang kasar serta melekat erat pada agar.

Diskus hidroksiapatit adalah media perlekatan bakteri *S. sanguinis* yang berasal dari reaksi suspensi kalsium hidroksida $Ca(OH)_2$ dan larutan asam fosfat [H_3PO_4 85%] buatan pabrik Merck KgaA menggunakan metode pengendapan kimia basah yang dibuat di Laboratorium Analisis Makanan Departemen Kimia Farmasi Fakultas Farmasi UGM.

Perlekatan bakteri *S. sanguinis* adalah kemampuan bakteri *S. sanguinis* untuk melekat pada diskus hidroksiapatit. Jumlah koloni bakteri yang mampu melekat dilakukan dengan cara

ditumbuhkan pada media agar Mitis Salivarius dan dihitung jumlah koloni yang tumbuh. Subjek penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah biakan bakteri *S. sanguinis* ATCC 10556 yang diperoleh dari PT. Multiredjeki Kita Laboratory and Solutions, Jakarta dan dikultur ulang di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada.

Alat dan Bahan

Alat : Beaker glass, Neraca digital, Tabung reaksi, Pipet tetes

Ose, Inkubator, Mikropipet dan tip, Microtube 1,5 ml, Indikator 0,5 McFarland, Screw cup 5 ml, Sentrifugator, Vortex, Cawan petri, Colony Counter, Autoklaf, Spreader, dan Filter dengan diameter pori 0,45 μ m dan 0,22 μ m.

Bahan : Serbuk kitosan udang galah, CH₃COOH 1 M, Akuades, Sodium asetat (NaCH₃COO) 3 M, Buffer asetat pH 6, Bakteri *S. sanguinis* pada agar miring, Larutan Phosphat Buffer Saline (PBS), Ekstrak kitosan kulit udang galah konsentrasi stok 1%, 0,5%, 0,25%, Suspensi bakteri, *Streptococcus sanguinis* (1,5 x 10⁸ CFU/ml), BHI broth dengan sukrosa 2%, Diskus, hidroksiapatit (HA), Saliva donor, dan Media agar Mitis Salivarius (MS).

Perhitungan jumlah replikasi pada penelitian ini ditentukan berdasarkan rumus Federer:

$$(n-1) \times (r-1) \geq 15$$

Keterangan:

n = jumlah replikasi

r = jumlah perlakuan (kelompok perlakuan)

Dengan jumlah perlakuan sebanyak 3, maka:

$$(n-1) \times (4-1) \geq 15$$

$$(n-1) \times 3 \geq 15$$

$$n-1 \geq 5$$

$$n \geq 6$$

Jumlah replikasi yang digunakan minimal 6 pada setiap kelompok perlakuan berdasarkan hasil perhitungan rumus.

Keterangan kelayakan etik diperoleh dari Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada dengan Nomor 00916/KKEP/FGK-UGM/EC/2017 pada tanggal 12 Januari 2017. Determinasi galur udang galah telah dilakukan oleh Ayuningtyas (2016) untuk memastikan bahwa udang yang digunakan pada penelitian ini adalah udang galah *Macrobrachium rosenbergii*. Determinasi dilakukan di Laboratorium Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada. Serbuk kitosan diperoleh dari peneliti sebelumnya yaitu Ayuningtyas (2016). Kitosan berasal dari kulit udang galah yang diperoleh melalui proses deproteinasi, demineralisasi, depigmentasi, dan deasetilasi. Pembuatan serbuk kitosan dilakukan di Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.

Pembuatan suspensi kitosan dilakukan mengacu pada penelitian Ayuningtyas (2016) menggunakan metode Wahyuni dkk. (2008) dengan modifikasi. Isolat kitosan diambil 0,5 gram dan dilarutkan dalam larutan asam asetat 1 M sebanyak 4,5 ml. Campuran tersebut kemudian disuspensikan dalam 5 ml larutan akuades dan diaduk dengan magnetic stirrer selama 3 jam hingga homogen. Suspensi yang telah homogen kemudian dicampur dengan sodium asetat (NaCH₃COO) 3 M hingga mencapai pH 6 menggunakan metode titrasi. Volume akhir ditetapkan menjadi 50 ml dengan menambah buffer asetat 0,05 M dengan pH 6. Suspensi difiltrasi menggunakan filter dengan diameter pori 0,45 μ m untuk mensterilkan larutan dan memisahkan garam sodium asetat. Hasil akhir berupa suspensi kitosan konsentrasi 1%. Pembuatan suspensi kitosan 0,5% dilakukan dengan cara mencampurkan suspensi kitosan 1% sebanyak 2 ml dengan 2 ml buffer asetat 0,05 M. Pembuatan suspensi kitosan 0,25% dilakukan dengan cara mencampurkan suspensi kitosan 1% sebanyak 1 ml dengan 3 ml buffer asetat 0,05 M.

Serbuk hidroksiapatit disintesis menggunakan metode pengendapan kimia basah yang berasal serbuk kalsium hidroksida $\text{Ca}(\text{OH})_2$ dan larutan asam fosfat [H_3PO_4 85%] kualitas pabrik Merck KgaA (Suryadi, 2011). Pembuatan serbuk hidroksiapatit dilakukan di Laboratorium Analisis Makanan Departemen Kimia Farmasi Fakultas Farmasi UGM. Serbuk hidroksiapatit dikompaksi untuk membentuk diskus hidroksiapatit berdiameter 10 mm dan ketebalan 3 mm menggunakan Universal Testing Machine pada tekanan 4 kgf. Diskus disintering pada suhu 500o C selama 2 jam (Thosar, n.d.).

Biakan bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah biakan *S. sanguinis* ATCC 10556 yang telah dikultur ulang pada media agar miring dari Laboratorium Mikrobiologi FKH UGM. Koloni bakteri diambil dari agar miring menggunakan ose untuk ditumbuhkan pada kaldu BHI dan diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator bersuhu 37o C. Setelah diinkubasi, bakteri yang tumbuh dalam kaldu BHI disentrifugasi 4000 rpm selama 15 menit. Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan mengambil endapan bakteri *S. sanguinis* ATCC 10556 menggunakan ose, lalu ditambahkan larutan PBS pH 7,2 hingga mencapai kekeruhan yang sama dengan standar McFarland 0,5 atau setara dengan konsentrasi bakteri $1,5 \times 10^8$ CFU/ml.

Uji efek kitosan udang galah terhadap perlekatan bakteri *S. sanguinis* pada diskus hidroksiapatit . Diskus HA disterilisasi menggunakan autoclave selama 15 menit pada suhu 121o C. Saliva yang digunakan untuk melapisi diskus hidroksiapatit berasal dari pendonor yang kondisi gigi dan jaringan periodontalnya sehat. Pengumpulan saliva pendonor dilakukan dengan metode (Fardiaz & Radiati, 2012). Saliva diambil dari pendonor pada pagi hari. Saliva selanjutnya divorteks selama 60 detik dan disentrifugasi pada 2000 rcf selama 60 menit pada suhu 4o C. Supernatan kemudian difiltrasi menggunakan filter dengan diameter pori sebesar 0,45 μm dan 0,22 μm .

Uji efek kitosan udang galah terhadap perlekatan bakteri *S. sanguinis* pada diskus hidroksiapatit didasarkan pada metode yang digunakan Lee dkk. (2011). Sebanyak 24 diskus hidroksiapatit direndam dalam saliva selama 1 jam. Diskus HA selanjutnya dicuci 3 kali dengan larutan PBS. Pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol disiapkan tabung screw cup 5 ml dan kemudian ditambahkan 1 buah diskus hidroksiapatit di masing-masing tabung. Selanjutnya, tabung screw cup kelompok perlakuan pertama diisi 400 μl suspensi kitosan konsentrasi 1%, kelompok perlakuan kedua diisi 400 μl suspensi kitosan konsentrasi 0,5%, kelompok perlakuan ketiga diisi 400 μl suspensi kitosan konsentrasi 0,25%. Kemudian pada semua kelompok perlakuan ditambahkan 500 μl media BHI broth dengan sukrosa 2% dan 100 μl suspensi bakteri *S. sanguinis* ($1,5 \times 10^7$ CFU/ml) sehingga konsentrasi akhir kitosan dengan suspensi bakteri dalam media BHI adalah 0,4%, 0,2%, 0,1%. Pada kelompok kontrol negatif, tabung screw cup diisi 900 μl media BHI broth dengan sukrosa 2% dan 100 μl suspensi bakteri *S. sanguinis* ($1,5 \times 10^7$ CFU/ml). Tabung diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37o C.

Diskus hidroksiapatit dibilas dengan larutan PBS pH 7,2. Bakteri *S. sanguinis* yang melekat pada diskus HA didispersi dengan menggunakan vorteks sehingga luruh dalam larutan PBS. Selanjutnya, untuk memudahkan perhitungan koloni bakteri dilakukan pengenceran dengan larutan PBS sebesar 10-3. Microtube yang telah diberi label 1, 2, 3 masing-masing diisi 900 μl PBS, kemudian 100 μl sampel dimasukkan ke microtube pengenceran pertama, kemudian diambil lagi 100 μl dari microtube pertama untuk dimasukkan ke microtube kedua, begitupula dengan microtube ketiga. Sampel dari microtube ketiga diambil 100 μl dan disebarkan pada media agar Mitis Salivarius menggunakan spreader. Media agar Mitis Salivarius diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37o C, kemudian koloni bakteri dihitung. Jumlah koloni bakteri (CFU/ml) = Jumlah koloni tiap cawan. Total faktor pengenceran.

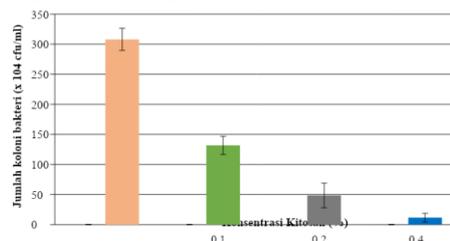
Data yang telah diperoleh dari penelitian ini berupa jumlah koloni bakteri *S. sanguis*. Data tersebut termasuk skala rasio sehingga digunakan uji statistik parametrik. Pertama-tama dilakukan uji normalitas Saphiro-Wilk dan uji homogenitas dengan metode Levene's Test. Jika data terdistribusi normal dan homogen, dilakukan pengolahan data dengan analisis parametrik one way analysis of variance (ANOVA) dengan signifikansi $\alpha=0,05$ untuk mengetahui pengaruh aplikasi kitosan terhadap perlekatan bakteri *S. sanguinis* pada diskus hidroksiapatit.

Uji least significant difference (LSD) dilakukan setelah didapatkan hasil yang signifikan pada uji ANOVA untuk melihat secara lebih detail perbedaan signifikansi antara tiap perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

Berikut adalah (Gambar 7) hasil uji pengaruh kitosan ekstrak kulit udang galah terhadap perlekatan bakteri *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556 pada diskus hidroksiapatit. Data disajikan sebagai rerata dan standar deviasi jumlah koloni bakteri *S. sanguinis* ATCC 10556 yang melekat pada diskus hidroksiapatit.



Gambar 1 Grafik rerata dan standar deviasi jumlah koloni bakteri *S. sanguinis* ATCC 10556 yang melekat pada diskus hidroksiapatit pada kelompok kontrol negatif, kitosan konsentrasi 0,1%, kitosan konsentrasi 0,2%, kitosan konsentrasi 0,4%

Hasil pengujian kitosan ekstrak kulit udang galah terhadap perlekatan bakteri *S. sanguinis* ATCC 10556 pada diskus hidroksiapatit menunjukkan kemampuannya dalam menurunkan jumlah koloni bakteri *S. sanguinis* ATCC 10556 yang melekat pada diskus hidroksiapatit seiring dengan bertambahnya konsentrasi kitosan. Rerata jumlah koloni bakteri pada kelompok perlakuan tersebut lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif.

Data selanjutnya dianalisis menggunakan program analisis statistik SPSS untuk mengetahui normalitas, homogenitas dan perbedaan signifikansi antar kelompok perlakuan.

Tabel 1 Rangkuman hasil uji normalitas (*Shapiro-wilk*) jumlah koloni bakteri *S. sanguinis* ATCC 10556 yang melekat pada diskus hidroksiapatit

Kelompok Perlakuan	Signifikansi
Kitosan konsentrasi 0,4%	0,859
Kitosan konsentrasi 0,2%	0,850
Kitosan konsentrasi 0,1%	0,923
Kontrol negatif	0,769

Tabel 1 menunjukkan bahwa data pada masing-masing kelompok perlakuan terdistribusi normal karena memenuhi kriteria, yaitu nilai signifikansi lebih dari 0,05. Data tersebut kemudian diuji homogenitas menggunakan uji *Levene's test*. Hasil uji homogenitas menunjukkan bahwa data memiliki variansi yang homogen karena memiliki nilai signifikansi 0,415 ($p > 0,05$). Dengan demikian, pada data hasil penelitian ini terdapat sebaran data yang normal dan memiliki variansi data yang homogen sehingga memenuhi syarat untuk dilakukan uji parametrik *One Way ANOVA*.

Tabel 2 Rangkuman hasil *One Way ANOVA* rerata jumlah koloni bakteri *S. sanguinis* ATCC 10556 yang melekat pada diskus hidroksiapatit

	Kuadrat Jumlah	Derajat Bebas	Kuadrat Rerata	F	Signifikansi
Antar kelompok	208947,101	3	69649,034	268,115	0,000*

Dalam kelompok	3117,276	12	259,773		
Total	212064,377	15			

Berdasarkan hasil uji *One Way* ANOVA (Tabel 2) diketahui $p=0,000$ ($p<0,05$) menunjukkan bahwa adanya perbedaan jumlah koloni bakteri *S. sanguinis* ATCC 10556 yang melekat pada diskus hidroksiapatit antar kelompok perlakuan secara bermakna. Hal tersebut menunjukkan bahwa kitosan ekstrak kulit udang galah berpengaruh terhadap jumlah koloni bakteri *S. sanguinis* ATCC 10556 yang melekat pada diskus hidroksiapatit. Selanjutnya dilakukan uji lanjutan *Post Hoc* LSD untuk membandingkan jumlah koloni bakteri *S. sanguinis* ATCC 10556 yang melekat pada diskus hidroksiapatit antar kelompok perlakuan.

Tabel 3 Rangkuman hasil uji Post Hoc LSD perbandingan jumlah koloni bakteri *S. sanguinis* ATCC 10556 yang melekat pada diskus hidroksiapatit antar kelompok perlakuan

Kelompok Perlakuan	Kitosan konsentrasi 0,4%	Kitosan konsentrasi 0,2%	Kitosan konsentrasi 0,1%
Kontrol Negatif	0,000*	0,000*	0,000*
Kitosan konsentrasi 0,4%	-	0,007*	0,000*
Kitosan konsentrasi 0,2%	-	-	0,000*
Kitosan konsentrasi 0,1%	-	-	-

* Berbeda signifikan ($p<0,05$)

Data (Tabel 3) menunjukkan terdapat perbedaan jumlah koloni bakteri *S. sanguinis* ATCC 10556 yang melekat pada diskus hidroksiapatit yang signifikan ($p<0,05$) antara kontrol negatif dan kitosan konsentrasi 0,4%, 0,2%, 0,1%. Perbedaan yang signifikan ($p<0,05$) juga kitosan konsentrasi 0,4% dibandingkan kitosan konsentrasi 0,2%, dan 0,1% serta antara kitosan konsentrasi 0,2% dengan kitosan konsentrasi 0,1%. Berdasarkan (Gambar 7 dan Tabel 3) diketahui bahwa kitosan konsentrasi 0,4% mampu menurunkan jumlah koloni bakteri *S. sanguinis* ATCC 10556 yang melekat pada diskus hidroksiapatit lebih banyak daripada kitosan konsentrasi 0,2% dan 0,1%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa kitosan ekstrak kulit udang galah konsentrasi 0,4% lebih efektif dalam menghambat perlekatan *S.sanguinis* dibandingkan dengan kitosan konsentrasi 0,2% dan 0,1%.

B. Pembahasan

Hasil penelitian menunjukkan adanya penurunan jumlah koloni bakteri *S. sanguinis* ATCC 10556 yang melekat pada diskus hidroksiapatit pada setiap kelompok yang diuji seiring dengan bertambahnya konsentrasi kitosan ekstrak kulit udang.

Hidroksiapatit merupakan salah satu bahan yang biasa digunakan dalam uji coba perlekatan bakteri karena merupakan suatu analogi email gigi (Blumhagen et al., 2014). Saliva mengandung glikoprotein yang mempunyai peran penting pada perlekatan spesifik bakteri (Razak dkk., 2003). Perlekatan awal bakteri *S. sanguinis* pada diskus hidroksiapatit yang dilapisi saliva terjadi melalui perlekatan non spesifik yang bersifat reversibel yaitu gaya elektrostatik dan interaksi hidrofobitas. Ion kalsium dari saliva menjadikan permukaan hidroksiapatit bermuatan positif dan dapat menimbulkan gaya elektrostatik dengan permukaan bakteri yang bermuatan negatif (Rao dkk., 1993).

Interaksi hidrofobisitas terjadi antara adhesin bakteri yang tersusun atas asam amino hidrofobik dengan suatu biomaterial yang bersifat hidrofobik seperti hidroksiapatit atau dengan komponen hidrofobik saliva seperti glikolipid, trigliserid dan asam lemak (Gibbons dan Etherden, 1983; Oga dkk., 1993). Permukaan hidroksiapatit memiliki muatan Ca^{2+} sehingga material ini lebih hidrofilik dibandingkan heksadena dan polistiren. Dari penelitian Harty dan Knox (1991) diketahui bahwa persentase perlekatan bakteri golongan *Lactobacillus* pada heksadena berkisar antara 0,9%-23%, pada polistiren berkisar antara 1,1%- 12,5% dan pada hidroksiapatit berkisar 0,1%-10,6%. Hal ini menunjukkan bahwa hidrofobisitas suatu material akan mempengaruhi perlekatan bakteri karena semakin hidrofob suatu material maka akan semakin banyak bakteri yang melekat. Polistiren dan hidroksiapatit yang dilapisi saliva akan menutupi sisi hidrofob material ini sehingga menjadi kurang hidrofobik dan bakteri yang melekat lebih sedikit (Seabra dkk., 2015). Persentase bakteri *Lactobacillus* yang melekat pada hidroksiapatit yang dilapisi saliva menurut Harty dan Knox (1991) adalah berkisar 0,3%-8,6%. Maka dari itu pada penelitian ini digunakan diskus hidroksiapatit yang dilapisi saliva karena material ini memiliki hidrofobisitas yang sama dengan struktur email gigi.

Penurunan hidrofobisitas bakteri dapat terjadi ketika zat yang dipaparkan mampu mengganggu struktur protein permukaan sel bakteri (Nostro dkk., 2004). Kemampuan kitosan menghambat perlekatan bakteri terjadi melalui interaksi elektrostatik yaitu ketika kation NH_3^+ dari kitosan berikatan dengan muatan negatif kelompok fosfat pada dinding sel bakteri. Interaksi elektrostatik tersebut menyebabkan *blocking-adhesin* bakteri oleh kitosan dan perubahan tingkat ekspresi ligan permukaan bakteri sehingga menyebabkan penurunan reaksi hidrofobisitas sel bakteri (Tarsi dkk., 1997; Stamford dkk., 2012). Penurunan hidrofobisitas tersebut menyebabkan bakteri kehilangan komponen ekstraseluler yang bersifat amfipatik (hidrofobik dan hidrofilik sekaligus) dan kemampuan perlekatan bakteri secara spesifik (Fardiaz, 2012; Stamford dkk., 2012).

Selain penurunan hidrofobisitas bakteri, interaksi elektrostatik menyebabkan terbentuknya *flocs* (gumpalan). Proses pembentukan gumpalan ini disebut flokulasi, yaitu proses ketika sel bakteri dan rantai kitosan saling berikatan satu sama lain dan membentuk jembatan antar sel bakteri. Pembentukan gumpalan tersebut menjadikan bakteri tidak dapat melekat dan berkolonisasi pada permukaan gigi (Stamford dkk., 2012).

Pada perlekatan spesifik, bakteri *S. sanguinis* menghasilkan enzim *glucosyltransferase* (GTF) yang mampu memecah sukrosa menjadi glukukan. Glukan membantu perlekatan *S. sanguinis* pada permukaan gigi melalui reseptor *glucan-binding protein* (Koo dkk., 2002). Jika produksi glukukan diganggu maka akan berdampak pada hilangnya kemampuan bakteri tersebut untuk melekat dan berkolonisasi (Chismirina, Andriyani, & Fitri, 2011). Interaksi elektrostatik kitosan dan bakteri menyebabkan terbentuknya membran polimer yang mencegah nutrisi masuk ke dalam sel bakteri. Penurunan jumlah nutrisi akan menurunkan aktivitas metabolisme bakteri untuk mensintesis dan mensekresi enzim GTF. Penurunan sintesis dan sekresi enzim GTF pada bakteri akan mengurangi jumlah glukukan ekstraseluler sehingga mengurangi perlekatan bakteri (Stamford dkk., 2012).

Penurunan produksi protein adhesin bakteri dapat menghambat perlekatan bakteri. Menurut Gabius (2008), ada beberapa cara untuk mencegah interaksi adhesin bakteri terhadap reseptor yaitu dengan cara menghambat terjadinya ikatan adhesin-reseptor, menghilangkan reseptor sel host, dan menekan produksi protein adhesin bakteri. Produksi adhesin dapat terhambat oleh karena adanya faktor ekstraseluler yang menekan interaksi interseluler dan perubahan pada membran sel. Kitosan mampu berpenetrasi ke nukleus sel bakteri dan berikatan dengan DNA sehingga menghambat sintesis mRNA dan protein (Hauser-Gerspach et al., 2007).

Aktivitas penghambatan perlekatan bakteri dapat terjadi dengan cara mengurangi jumlah bakteri hidup. Pengurangan jumlah bakteri hidup disebabkan adanya zat antibakteri yang terpapar pada bakteri (He, dkk, 2013). Mekanisme antibakteri kitosan adalah melalui interaksi dan mengubah permeabilitas membran sel bakteri sehingga menyebabkan kebocoran material protein serta kematian bakteri. Kitosan juga bekerja sebagai *chelating agent* yang secara selektif mengikat logam esensial sehingga menghambat pertumbuhan bakteri (Kong dkk., 2010).

Menurut Stamford (2012), *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) kitosan udang terhadap *S. sanguinis* dengan derajat deasetilisasi 65% adalah 0,125%, sedangkan derajat deasetilisasi kitosan ekstrak kulit udang milik peneliti sebelumnya Ayuningtyas (2016) adalah 72,94%. Derajat deasetilisasi ini akan mempengaruhi MIC dan MBC kitosan terhadap bakteri (Stamford, 2012). Pada penelitian ini digunakan kitosan dengan konsentrasi 0,4% belum dapat dikatakan bersifat bakterisid yang melebihi MIC seperti pada penelitian terdahulu dikarenakan adanya perbedaan derajat deasetilisasi kitosan. Hal ini terbukti dari kitosan konsentrasi 0,4% mampu mengurangi koloni bakteri yang melekat pada diskus hidroksiapatit serta memiliki efektivitas lebih besar dari kitosan 0,2% dan kitosan 0,1% memiliki efektivitas yang lebih besar dari kitosan 0,1%. Diperkirakan dengan meningkatnya konsentrasi kitosan ekstrak kulit udang dapat menyebabkan pengurangan jumlah bakteri hidup dan menurunkan jumlah koloni bakteri *S. sanguinis* yang melekat pada diskus hidroksiapatit. Hal tersebut dikarenakan perbedaan jumlah gugus amina polikationik yang dapat berikatan dengan permukaan bakteri (Goy dkk., 2009).

Berdasarkan hasil penelitian ini, kitosan ekstrak kulit udang memiliki potensi untuk menghambat perlekatan bakteri pada permukaan gigi sehingga mampu mencegah terbentuknya plak gigi yang merupakan penyebab terjadinya karies gigi.

KESIMPULAN

Kesimpulan penelitian diatas adalah Kitosan ekstrak kulit udang galah mampu mengurangi perlekatan bakteri *S. sanguinis* ATCC 10556 pada diskus hidroksiapatit. Kitosan ekstrak kulit udang galah konsentrasi 0,4% lebih efektif dalam mengurangi jumlah koloni bakteri *S. sanguinis* ATCC 10556 yang melekat pada diskus hidroksiapatit daripada kitosan 0,2% dan kitosan 0,1%.

BIBLIOGRAFI

- Bhat, Manohara, Prasad, K. V. V, Trivedi, Dhiraj J., & Acharya, Anirudh B. (2014). *Dental plaque dissolving agents: An in vitro study*.
- Blumhagen, Adam, Singh, Prashant, Mustapha, Azlin, Chen, Meng, Wang, Yong, & Yu, Qingsong. (2014). Plasma deactivation of oral bacteria seeded on hydroxyapatite disks as a tooth enamel analogue. *American Journal of Dentistry*, 27(2), 84.
- Chismirina, Santi, Andriyani, Poppy, & Fitri, Nopi Yanti. (2011). Efek Ekstrak Buah Jamblang terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans* sebagai Penyebab Utama Karies. *Dentika Dental Journal*, 16(2), 144–148.
- Chowdhury, Md Rabiul Hossain, Bhuiyan, Md IqbalKaiser, Saha, Ayan, Mosleh, Ivan MHAI, Mondol, Sobuj, & Ahmed, C. M. Sabbir. (2014). Identification and analysis of potential targets in *Streptococcus sanguinis* using computer aided protein data analysis. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry*, 45–54.
- Costa, E. M., Silva, S., Pina, C., Tavarria, F. K., & Pintado, M. M. (2012). Evaluation and insights into chitosan antimicrobial activity against anaerobic oral pathogens. *Anaerobe*, 18(3), 305–309.
- Davassi, Laleh Abbaspour. (2011). Survival and growth of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* in relation to different nutrients composition. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 6(6), 649.
- Fardiaz, Dedi, & Radiati, Lilik Eka. (2012). Effect of whey goat milk kefir on hydrophobicity of *E. coli* O157: H7, *S. typhi* bacteria and *C. albicans*. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Hasil Ternak (JITEK)*, 7(1), 12–18.
- Forssten, Sofia D., Björklund, Marika, & Ouwehand, Arthur C. (2010). *Streptococcus mutans*, caries and simulation models. *Nutrients*, 2(3), 290–298.
- Gabius, Hans Joachim. (2008). Glycans: bioactive signals decoded by lectins. *Biochemical Society Transactions*, 36(6), 1491–1496.
- Hauser-Gerspach, Irmgard, Kulik, Eva M., Weiger, Roland, Decker, Eva Maria, Von Ohle, Christiane, & Meyer, Jürg. (2007). Adhesion of *Streptococcus sanguinis* to dental implant and restorative materials in vitro. *Dental Materials Journal*, 26(3), 361–366.

- He, Jinzhi, Wang, Shida, Wu, Tingxi, Cao, Yangpei, Xu, Xin, & Zhou, Xuedong. (2013). Effects of ginkgoneolic acid on the growth, acidogenicity, adherence, and biofilm of *Streptococcus mutans* in vitro. *Folia Microbiologica*, 58, 147–153.
- Heymann, Harald O., Swift Jr, Edward J., & Ritter, Andre V. (2012). *Sturdevant's Art & Science of Operative Dentistry-E-Book: Sturdevant's Art & Science of Operative Dentistry-E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Ibrahim, Israa Abdul Jabbar, & Hameed, Tuqa Abdul Kareem. (2015). Isolation, characterization and antimicrobial resistance patterns of lactose-fermenter enterobacteriaceae isolates from clinical and environmental samples. *Open Journal of Medical Microbiology*, 5(04), 169–176.
- Kong, Ming, Chen, Xi Guang, Xing, Ke, & Park, Hyun Jin. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 51–63.
- Thosar, N. (n.d.). Changing Trends In Oral Hygeine and Plaque Con-trol In Children.(2016) *J Dent Oral Care* 1 (2): 79-83. *J Dent Oral Care*, 1(2).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License.