

Research Report

Konsentrasi Efektif Daya Antibiofilm Kitosan Cangkang Udang terhadap *Streptococcus Viridans*

(The Effective Concentration of Antibiofilms Capacity from Shrimp Shells Chitosan towards *Streptococcus Viridans*)

NurAriska Nugrahani¹, Sri Kunarti² and Laksmiari Setyowati²

¹Student of Dentistry, Faculty of Dentistry, Airlangga University, Surabaya

²Department of Conservative, Faculty of Dentistry, Airlangga University, Surabaya

ABSTRACT

Background. Periapical tooth infection is one of infection problems which often happens such as abscess periapical which is caused by bacteria. The bacteria which can form biofilms is named streptococcus viridans. It is resistant towards an antibacterial agent. Chitosan made of shrimp shells is used as a natural antibiofilms agent for streptococcus viridans. **Purpose.** To determine the effective concentration of antibiofilms capacity from shrimp shells chitosan towards streptococcus viridans. **Method.** The research method used in this research is laboratory experimental research. The research design is post-test only control group design. *Streptococcus viridans* is given vortex until it becomes homogeneous with standard turbidity McFarland of 0.5, then, it is planted inside a microtiter plate using TSB Glu for 5x24 hours. At last, *Streptococcus viridans* is colored using crystal violet and the picture of biofilms is observed using inverted microscope. Chitosan liquid diluted through various concentration 0.195%, 0.39%, 0.78%, 1.56%, 3.125%, 6.25%, 12.5%, 25%, 50% and 100% are going to be added to the microtiter plate and being incubated for 24 hours. The interpretation of the result on the longitude of the wave through optical density is 570nm. **Result.** There is a significant difference between the concentration of 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%, 1.56%, 0.78%, and 0.39% and the control group. Chitosan's effective concentration in resisting the biofilms is 50%. The result is determined by statistical analysis. **Conclusion.** The effective concentration to resist the formation of *Streptococcus viridans* biofilms using shrimp shells chitosan is 50%.

Keywords: *Streptococcus viridans*, antibiofilms, shrimp shells chitosan

Korespondensi (Correspondence) : NurAriska Nugrahani; Student of Dentistry, Department of Conservative Faculty of Dentistry, Airlangga University, Jln. Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya 60132, Indonesia. Email : nugrahani.ariska.nur@gmail.com

PENDAHULUAN

Flora mikrobial pada saluran akar umumnya sama dengan rongga mulut seperti bakteri gram positif. *Streptococcus* merupakan gram positif, golongan *Streptococcus* alfa-hemolitik yaitu *Streptococcus Viridans* sebagai spesies *Streptococcus* paling banyak akibat infeksi saluran akar.¹ Kultur bakteri yang diidentifikasi dari saluran akar pre-dominan adalah *Streptococcus Viridans* (40-48%), *Lactobacillus* dan *Eubacterium* (31-35%) ada di dalam pulpa yang bernanah.² *Streptococcus viridans* telah dilakukan survei terhadap antimikrobal dan didapatkan bahwa *streptococcus viridans* resisten terhadap penisilin, sefalosporin, aminoglikosid dan agen antimikroba lain.³ *Streptococcus viridans* masuk kedalam darah melalui mucous membran atau dekat dengan abses pulpa. *Streptococcus viridans* ini akan membentuk koloni di *mucous membrane* atau dental plak yang dapat masuk ke

sirkulasi sel, membentuk rantai seperti cocci (bulat atau fragmen biofilm).⁴ Biofilm adalah komunitas sel bakteri yang terstruktur dan saling menempel, bakteri yang mampu memproduksi matriks polimer ekstraseluler dan mampu melekat pada permukaan biologis ataupun saluran akar.⁵ Pembentukan biofilm dengan cara adsorpsi molekul anorganik dan organik kemudian akan melekat dan membentuk kolonisasi dalam saluran akar, selanjutnya menjadi biofilm.⁶

Perawatan saluran akar merupakan pilihan perawatan antara lain untuk nekrosis pulpa. Tujuan dari perawatan saluran akar adalah mengeliminir bakteri patogen, menghilangkan jaringan nekrotik dan membantu proses penyembuhan periapikal.^{7,8} Terdapat tiga prinsip dasar dalam perawatan saluran akar adalah preparasi biomekanik, irigasi dan desinfeksi serta pengisian saluran akar.⁹

Bahan yang digunakan untuk pasta saluran akar antara lain ialah pasta kalsium hidroksida dan zinc oxide eugenol. Fungsi dari pasta saluran akar adalah sebagai bahan pengisi setelah dilakukan preparasi dan untuk mencegah pembentukan biofilm didalam saluran akar.¹⁰ Bahan untuk pasta saluran akar yang telah digunakan beberapa masih memiliki kelemahan seperti bahan zinc oxide eugenol dapat mengiritasi jaringan dan bersifat sitotoksik apabila digunakan secara berlebihan¹¹ dan bahan kalsium hidroksida memiliki kemampuan buffer dentin yang mempertahankan kondisi *alkaline* yang dibutuhkan untuk membunuh bakteri, juga menghambat penetrasi ion *hydroxyl* ke jaringan pulpa.¹² Banyak saluran akar yang positif mengandung bakteri yang meningkat setelah perawatan saluran akar dengan kalsium hidroksida, sehingga diperlukan bahan alami yang dapat dikembangkan sebagai bahan alternatif. Salah satu bahannya adalah kitosan yang berasal dari cangkang udang.

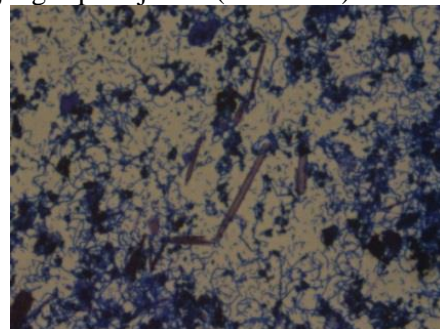
Kitosan yang diambil dari cangkang udang ini merupakan co-polimer alam yang tersusun oleh 2-asetamida-2-desoksi-D-glycopyranose yang dihubungkan oleh ikatan glikosidik β .¹³ Kitosan dapat berfungsi sebagai agen antibiofilm untuk menghambat dan merusak biofilm yang sudah matang.¹⁴ Beberapa penelitian, membahas bahwa kitosan bisa digunakan sebagai antibiofilm terhadap pembentukan biofilm pada *Streptococcus sanguis* dan *candida albicans*, dengan hasil efektif pada kombinasi chlorhexidine konsentrasi 0,1% dan kitosan pada konsentrasi 0,5%,¹⁵ kitosan nanopartikel ini mempunyai antimikroba terhadap *Streptococcus mutans* dengan cara merusak sel membran dan menghambat pembentukan biofilm dari *Streptococcus mutans*.¹⁶ Kitosan sebagai antimikrobia dan antibiofilm terhadap *Candida Albicans* dan *Streptococcus mutans* dengan konsentrasi paling efektif 0,75 mg/ml dalam menghambat pembentukan biofilm.¹⁷ Namun sampai saat belum adanya penelitian mengenai aktivitas antibiofilm dari kitosan pada cangkang udang terhadap *streptococcus viridans*. Berdasarkan pada hal tersebut di atas timbul suatu rumusan masalah: Berapakah konsentrasi efektif daya antibiofilm kitosan cangkang udang terhadap *streptococcus viridans*? Tujuan penelitian untuk mengetahui konsentrasi efektif daya antibiofilm kitosan cangkang udang terhadap *streptococcus viridans*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan sampel stok bakteri *Streptococcus viridans* dan kitosan yang berasal dari cangkang udang. Bakteri *Streptococcus viridans* diencerkan sesuai standar Mc Farland 0,5. Bakteri *Streptococcus viridans* dikultur pada media TSB Glu dalam *microtiter plate* dan diinkubasi (5 hari dalam 37⁰ C) hingga terbentuk biofilm. Pengecekan biofilm dengan pewarnaan simple staining (*Crystal Violet*) kemudian diamati dengan mikroskop inverted. Setelah diketahui pembentukan biofilm *Streptococcus viridans* pada hari ke-5 kemudian ditambahkan 0,1 ml suspensi kitosan pada konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78%, 0,39% dan 0,195%, kontrol positif berupa biofilm *Streptococcus Viridans* dan kontrol negatif berupa media TSB Glu dalam *microtiter plate*, kemudian diinkubasi *mictotitter* dalam inkubator pada suhu 37⁰C selama 24 jam, *microtitter* dicuci 3 kali dengan 0,2 ml Phosphatase-buffered saline (pH 7,3), masing-masing *microtitter* diuji proses pewarnaan dengan *crystal violet* 0,2 ml 2%, pembilasan dengan menggunakan aquadest kemudian dikeringkan dan ditambahkan 0,2 ml dari HCl isopropanol pada setiap *well*. Diukur dengan ELISA reader dan dilihat *Optical Density* dengan panjang gelombang 570nm. Data yang diperoleh dianalisis dengan Uji *Kruskal Wallis* dan dilanjutkan uji *Mann-Whitney*.

HASIL

Hasil penelitian menunjukkan bentuk biofilm dari *streptococcus viridans* terlihat panjang seperti jarum. (Gambar 1).



Gambar 1. Biofilm Bakteri *Streptococcus Viridans* yang tumbuh setelah inkubasi hari ke-5

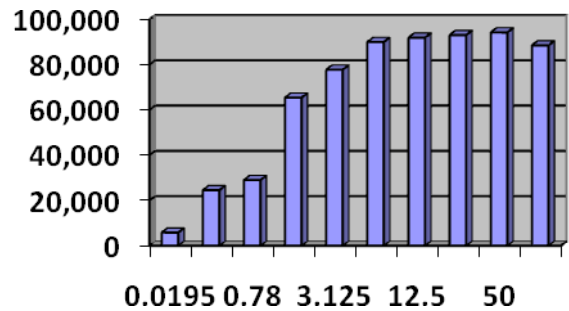
Pengamatan kemampuan antibiofilm kitosan terhadap *Streptococcus Viridans* dibaca menggunakan *Elisa Reader* pada panjang gelombang 570 nm yang menilai kemampuan antibiofilm dan dinyatakan dalam satuan *Optical Density* (OD).

Dan didapatkan hasil penghitungan persentase penghambatan :

Tabel2. Hasil Perhitungan Persentase Penghambatan Bahan Uji Kitosan

Konsentrasi Kitosan	Mean (Rata-rata)	Persentase Penghambatan
100%	0,101	88,470 %
50%	0,051	94,178 %
25%	0,061	93,036 %
12,5%	0,071	91,894 %
6,25%	0,088	89,954 %
3,125%	0,195	77,739 %
1,56%	0,303	65,411 %
0,78%	0,622	28,995 %
0,39%	0,661	24,543%
0,0195%	0,825	5,822 %

Dari data pada tabel diatas, dapat dilihat bahwa konsentrasi efektif daya antibiofilm kitosan dalam menghambat biofilm *streptococcus viridans* sebesar 94,178% sehingga dapat disimpulkan bahwa konsentrasi 50% merupakan konsentrasi efektif daya antibiofilm kitosan terhadap *streptococcus viridans*. (Gambar 2).



Gambar 2. Grafik Persentase penghambatan Biofilm *Streptococcus viridans*

Kemudian data dari (Tabel1) diuji statistik. Sebelum dilakukan uji antar kelompok masing-masing kelompok diuji distribusi sampel menggunakan uji statistic *Kolmogrov Smirnov Test*. Hasil uji didapatkan $p > 0,05$ yang berarti data berdistribusi normal. Untuk menentukan data yang diperoleh homogeny atau tidak dengan uji *Levenne* didapatkan nilai $p = 5,535$ yang berarti $p < 0,05$ berarti data tidak homogen maka uji selanjutnya menggunakan uji non-parametrik. Hasil pada *Kruskal Wallis* didapatkan signifikansi 0,000 ($p < 0,05$) yang berarti ada perbedaan yang signifikansi antara konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78%, 0,39% dan 0,195% dengan kelompok kontrol. Hasil uji *Mann-Whitney Test* dilihat pada (Tabel3). Pada uji *Mann-Whitney* didapatkan bahwa konsentrasi 50% mempunyai perbedaan yang bermakna terhadap semua konsentrasi dan kontrol positif sehingga dapat disimpulkan bahwa konsentrasi 50% ini memang yang terbaik.

Tabel 3. Uji *Mann-Whitney* dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78%, 0,39% dan 0,195% dengan kelompok kontrol.

	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,56	0,78	0,39	0,195	Kontrol (+)
100		0,004*	0,004*	0,004*	0,024*	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*
50			0,013*	0,04*	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*	0,007*	0,004*	0,004*
25				0,016*	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*
12,5					0,02*	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*	0,004	0,004*
6,25						0,004*	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*
3,125							0,03*	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*
1,56								0,004*	0,004*	0,004*	0,004*
0,78									0,522	0,109	0,004*
0,39										0,423	0,004*
0,195											0,262
Kontrol (+)											

(*) Konsentrasi yang memiliki perbedaan yang bermakna

PEMBAHASAN

Sebelum dilakukan penelitian ini, untuk mengetahui pembentukan biofilm pada *streptococcus viridans* yang dilihat melalui mikroskop inverted, diuji pada hari ke-2 dan ke-5, pada hari ke-2 ditemukan pembentukan biofilm yang masih sedikit dan belum terbentuk sempurna (yang masih mendominasi bakteri *streptococcus viridans*), namun pada hari ke-5 telah terlihat biofilm yang menyerupai bentukan jarum. Hal ini sesuai dengan teori *stationary-phase evolution* bahwa bakteri ini akan tumbuh biofilm mulai hari ke-2 dan mencapai puncaknya pada hari ke-5 kemudian mengalami penurunan pada hari ke-6.¹⁹ Kitosan ini diencerkan dulu dalam asam asetat sehingga bisa terurai dan menjadi larutan kitosan. Dalam penelitian ini, digunakan kitosan dengan berbagai konsentrasi, yaitu 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78%, 0,39% dan 0,195% dengan tujuan untuk mengetahui konsentrasi efektif daya antibiofilm kitosan terhadap *streptococcus viridans*. Replikasi pada tiap-tiap konsentrasi dilakukan sebanyak 6 kali. Dan didapatkan hasil berupa nilai OD (*Optical Density*). Kemudian dilakukan perhitungan persentase penghambatan dengan menggunakan rumus. Pada konsentrasi 0,78% sampai 50% persentase penghambatan mengalami peningkatan. Kemudian mengalami penurunan persentase penghambatan pada konsentrasi 100%.

Konsentrasi efektif diketahui dengan cara membandingkan nilai *Optical Density microtiter plate* dengan kontrol positif, yang memiliki persentase penghambatan biofilm paling besar dalam penelitian ini didapatkan konsentrasi efektif pada konsentrasi 50% dengan persentase penghambatan sebesar 94,178%. Kemungkinan hal ini disebabkan karena pada konsentrasi 50%, dalam pengenceran dilusi berisi 2,5 ml larutan kitosan 100% : 2,5 ml aquadest, jadi tidak terlalu pekat dan tidak terlalu encer sehingga kitosan dapat berdifusi dengan baik dan efektif sebagai antibiofilm pada konsentrasi 50%.

Setelah dilakukan penghitungan persentase penghambatan juga dan untuk menambah ketelitian dari hasil penelitian diuji analisis statistik. Uji *Kolmogrov-Smirnov* menunjukkan data berdistribusi normal, pada uji *LevenneTest* menunjukkan data tidak homogen. maka uji selanjutnya menggunakan uji analisis non parametrik *Kruskal Wallis* yang menunjukkan nilai signifikan $p < 0,05$ serta Uji *Mann Whitney* yang menunjukkan bahwa konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78% dan

0,39% mempunyai perbedaan yang bermakna dengan kelompok kontrol

Pada konsentrasi 0,78% tidak signifikan terhadap konsentrasi 0,39%, 0,195% begitu juga dengan konsentrasi 0,39% tidak signifikan dengan konsentrasi 0,195%, kemungkinan disebabkan karena rerata nilai *optical density* dari konsentrasi tersebut hampir sama dan dalam perhitungan statistik hal itu dianggap sama dan tidak signifikan. Pada konsentrasi 0,195 tidak mempunyai perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol, kemungkinan karena persentase penghambatan hanya 5,822% dan didapatkan nilai OD yang besar hal ini disebabkan oleh saat pewarnaan *crystal violet* terlihat adanya masih ada kekeruhan dari bakteri *streptococcus viridans* sehingga yang mendominasi bukan dari bahan kitosan tapi dari bakteri *streptococcus viridans* sehingga nilai OD yang besar dan penghambatannya kecil.

Pada konsentrasi 50% ke 100% mengalami penurunan padahal kalau konsentrasi semakin naik maka penghambatan juga semakin besar. Hal ini disebabkan karena kitosan memiliki salah satu sifat kimia yang merugikan apabila berkontak dengan asam teikoat yang dimiliki *streptococcus viridans* yaitu memiliki titik jenuh sehingga dalam menghambat pembentukan biofilm ada kemungkinan hasilnya akan stagnan dan kemudian mengalami penurunan.¹³

Dari penelitian sebelumnya¹⁴ juga menggunakan kitosan sebagai antibiofilm terhadap *streptococcus mutans* menunjukkan efek yang kuat sebagai antibiofilm dengan menghambat dan merusak biofilm yang sudah matang. Kitosan ini menghambat dan merusak biofilm yang sudah matang dengan meningkatkan aktivitas muatan positif (kation) untuk mengganggu struktur biofilm yang telah terbentuk. Hal ini disebabkan karena menghambat dan merusak biofilm *streptococcus mutans* yang sudah matang lebih sulit karena saat biofilm sudah terbentuk maka bakteri akan mengeluarkan EPS sebagai bentuk pertahanan diri dan kitosan memiliki titik jenuh dalam merusak biofilm yang sudah matang.¹⁴

Hasil penelitian yang menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan tersebut sesuai dengan teori yang ada. Kitosan terbukti bersifat antibiofilm. Berdasarkan teori, kitosan mempunyai gugus amina yang digunakan sebagai antibiofilm. Gugus amina yang berasal dari NH_2 yang berubah menjadi NH_3^+ akan berikatan dengan asam teikoat yang dimiliki oleh *Streptococcus Viridans* yang bermuatan negatif. Kemudian pembentukan peptidoglikan pada dinding sel

terganggu sehingga bisa merusak membran sel dan mengakibatkan sel bakteri lisis. Jika hal ini terjadi terus menerus maka metabolisme sel akan terganggu dan kolonisasi yang dibentuk akan menurun. Kitosan dengan berat molekul rendah dapat menembus dalam sel mikroorganisme sehingga bisa menghambat transkripsi dan translasi dari DNA *Streptococcus Viridans* dan apabila DNA sudah dihambat akan mengalami mutasi yang diakibatkan oleh pemecahan rantai DNA.²⁰

Berdasarkan hasil dan pembahasan dalam penelitian ini maka dapat disimpulkan bahwa konsentrasi efektif daya antibiofilm kitosan cangkang udang terhadap *Streptococcus viridans* adalah 50%.

DAFTAR PUSTAKA

1. Rao N. *Advanced Endodontics*. 1st ed. USA : Jaypee Brothers Medical Publishers (P) LTD. 2009. p:64-70.
2. Chandra BS and Khrisna VG. *Grossman's Endodontics practice*. 12th ed. New Delhi : Wolters Kluwer pvt ltd. 2010. p:81.
3. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P and Woods P. *Koneman Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th ed. USA : Lippincott William and Wilkins. 2006.p: 695.
4. Steven, DL and Kaplan EL. *Streptococcal Infections : Clinical Aspects, Microbiology, and Molecular Pathogenesis*. ISBN O-19-509921-4. Oxford : Oxford University Press, Inc, 2000. p: 334-336.
5. Setiawan VM, Estoepangestie S, Koesdarto S. Pembentukan biofilm oleh *Streptococcus uberis* terkait dengan infeksi kronis intramamary. *JBP*2012; 14(3):153-157.
6. Hojo K, Nagaoka, Ohshima, and Maeda. Bacterial interactions in dental biofilm development. *Journal of Dental Research*2009; 88(11):982-990.
7. Rhodes, J.S. *Advanced Endodontics Clinical Retreatment and Surgery*, Taylor and Francis Group London, 2006. p:130.
8. Saunders, W. Lates Concepts in Root Canal Treatment. *British Dental Journal*2005;198(8):515.
9. Ford, T.R.P. *Harty's Endodontics in Clinical Practice*, Elsevier Churchill Livingstone, 2004.p:85-86.
10. Walton, RE and Torabinejad M. Alih bahasa, Narlan Sumawinata. *Prinsip dan Praktik Ilmu Endodonsia*. Edisi 3. Jakarta : EGC. 2003. p: 230-232.
11. Wen C, Kao Chia Tze, Tsui Hsien Huang. Comparison of the biocompatibility between 2 endodontic filling material for primary teeth. *Chin Dent J* 2005; 24(1):28-34.
12. Nurko, C. Clinical Section Resorption of a Calcium Hydroxide/Iodoform Paste (Vitapex) in Root Canal Therapy for Primary Teeth: A Case Report. *Pediatric Dentistry San Antonio*2000; 22(6):12-18.
13. Kurniasih M and Kartika D. Sintesis dan Karakterisasi Fisika-Kimia Kitosan. *Jurnal Inovasi*2011; 5(1):42-48.
14. Costa E, Silva S, Tavaría F and Pintado M. Study of the effect of chitosan upon *Streptococcus mutans* adherence and biofilm formation. *J. Anaerob*2013; 20:27-31.
15. Archana V, Prabhuji M, Karthikeyan B and Selvan A. Control of *Streptococcus sanguinis* oral biofilm by novel chlorhexidine – chitosan mouthwash : an in vitro study. *J exp Integr Med*2013; 3(2):165-169.
16. Paz L, resin A, Howard K, Sutherland D and Wejse P. *Antimicrobial effect of Chitosan Nanoparticles on streptococcus mutans Biofilms*, 2011;77(11):3892-3895.
17. Costa E, Silva S, Tavaría F and Pintado M. Antimicrobial and Antibiofilm activity of Chitosan on the Oral Pathogen *Candida Albicans*. *Article Pathogens*. ISSN 2076-0817. 2014. p: 908-919.
18. Bakkiyaraj D, Nandhini JR, Malathy Balakumar and Pandian SK. 2013. The anti-biofilm potential of pomegranate (*Punica granatum L*) extract against human bacterial and fungal pathogens. *Biofouling*2013; 29(8):930.
19. Druzina BV, Butarac A, Mrvcic J, Dragicevic TL and Tomas VS. Bacterial Stationary-Phase Evolution. *Biotechmol* 2011; 49(1):14-19.
20. Orlando, Orinda and Hiunade. Demonstration of antibiofilm and antifungal efficacy of chitosan against candidal biofilms, using an in vitro central venous catheter model. *J. Infect Disc* 2009;201(9):1436-1440.