

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



**ADHERENSI BIOFILM STREPTOCOCCUS MUTANS  
SETELAH DIPAPAR SUKROSA, LAKTOSA DAN XYLITOL**

**TAHUN KE – 1 DARI RENCANA 2 TAHUN**

<b>PRAWATI NURAINI, drg, M.Kes, Sp KGA (K)</b>	<b>0009076307</b>
<b>Dr. INDAH LISTIANA K., drg, M.Kes</b>	<b>0030106303</b>
<b>Prof. Dr. SOEGENG WAHLUYO, drg, M.Kes, SpKGA (K)</b>	<b>0010115405</b>

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

**UNIVERSITAS AIRLANGGA  
NOVEMBER 2018**





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

KKK  
KK  
LP.45/19  
Nur  
a



**ADHERENSI BIOFILM STREPTOCOCCUS MUTANS  
SETELAH DIPAPAR SUKROSA, LAKTOSA DAN XYLITOL**

**TAHUN KE – 1 DARI RENCANA 2 TAHUN**

<b>PRAWATI NURAINI, drg, M.Kes, Sp KGA (K)</b>	<b>0009076307</b>
<b>Dr. INDAH LISTIANA K., drg, M.Kes</b>	<b>0030106303</b>
<b>Prof. Dr. SOEGENG WAHLUYO, drg, M.Kes, SpKGA (K)</b>	<b>0010115405</b>

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

**UNIVERSITAS AIRLANGGA  
NOVEMBER 2018**

Judul : ADHERENSI BIOFILM STREPTOCOCCUS MUTANS  
SETELAH DIPAPAR SUKROSA, LAKTOSA DAN  
XYLITOL

**Peneliti/Pelaksana**  
Nama Lengkap : PRAWATI NURAINI, S.KG, M.Kes  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga  
NIDN : 0009076307  
Jabatan Fungsional : Lektor Kepala  
Program Studi : Ilmu Kesehatan Gigi Anak  
Nomor HP : 08123524095  
Alamat surel (e-mail) : prawati-n@fkg.unair.ac.id

**Anggota (1)**  
Nama Lengkap : Dr. drg INDAH LISTIANA KRISWANDINI M.Kes  
NIDN : 0030106303  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

**Anggota (2)**  
Nama Lengkap : Dr. drg SOEGENG WAHLUYO Sp.K.G.A, M.Kes  
NIDN : 0010115405  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

**Institusi Mitra (jika ada)**  
Nama Institusi Mitra : -  
Alamat : -  
Penanggung Jawab : -  
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun  
Biaya Tahun Berjalan : Rp 100,000,000  
Biaya Keseluruhan : Rp 200,000,000



Mengetahui,  
Wadek FKG Unair

(Prof. Dr. Anita Yulianti, drg, M.Kes)  
NIP/NIK 195807091985032001

Kota Surabaya, 12 - 11 - 2018  
Ketua,

( PRAWATI NURAINI, S.KG, M.Kes)  
NIP/NIK 196307091987012001



Menyetujui,  
Ketua LPI

(Prof.H.Hery Purnobasuki, Drs, M.Si, PhD)  
NIP/NIK 196705071991021001



## RINGKASAN

*Streptococcus mutans* merupakan bakteri yang paling mendominasi dan diduga sebagai penyebab utama karies gigi karena dapat membentuk biofilm. Pada prinsipnya dalam pembentukan biofilm dibutuhkan 3 hal, yaitu bakteri, glikokalik, dan permukaan luar sel bakteri. Apabila salah satu dari ketiganya tidak ada, maka biofilm tidak akan terbentuk. Biofilm dapat menjadi sangat sulit untuk dimatikan karena adanya material glikokalik. Banyak infeksi persisten yang terjadi di dalam tubuh disebabkan oleh biofilm bakteri. Salah satunya adalah plak gigi yang dibentuk oleh glikokalik yang dihasilkan oleh *Streptococcus mutans*.

Sukrosa yang banyak didapatkan pada makanan yang sering dikonsumsi oleh anak-anak, demikian juga laktosa adalah gula yang sering didapatkan pada susu adalah faktor yang paling penting dalam membentuk biofilm dan mengawali terjadinya karies gigi. Sukrosa maupun laktosa adalah disakarida yang dapat difermentasi sebagai substrat untuk pembentukan polisakarida extracellular. Perubahan lingkungan pada permukaan gigi yang disebabkan oleh karena adanya sukrosa akan mengganggu keseimbangan dan meningkatkan populasi bakteri asidogenik diantaranya *Streptococcus mutans*. Usaha-usaha yang dilakukan sebagai pengganti gula digunakan xylitol yang digunakan untuk mencegah karies gigi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis salah satu virulensi adalah adhesi dari biofilm *Streptococcus mutans* setelah dipapar sukrosa, laktosa dan xylitol.

MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

## PRAKATA

Assalamualaikum Wr Wb.,

Puji syukur kehadiran Allah SWT., atas berkah, rahmat dan hidayahNya, sehingga dapat menyelesaikan laporan penelitian ini. Sholawat dan salam semoga senantiasa tercurahkan kepada junjungan nabi Muhammad SAW yang telah membawa risalah Islam yang penuh dengan ilmu pengetahuan, sehingga dapat menjadi bekal di dunia maupun diakhirat.

Penelitian ini dilaksanakan dalam rangka tugas dosen dalam menjalankan Tri Darma Perguruan Tinggi yaitu bidang Pendidikan, Penelitian dan Pengabdian Masyarakat. Suatu kebahagiaan tersendiri dapat menyelesaikan tugas penelitian yang berjudul ADHERENSI BIOFILM *STREPTOCOCCUS MUTANS* SETELAH DIPAPAR SUKROSA, LAKTOSA DAN XYLITOL dengan sebaik-baiknya.

Penulis sadar banyak hambatan yang ada dalam melaksanakan penelitian ini, dikarenakan fasilitas penelitian yang digunakan berada diluar institusi di luar kota dan ketersediaan bahan yang harus menunggu pesanan dari luar negri. Kalaupun pada akhirnya karya ini dapat terselesaikan tentulah karena beberapa pihak yang membantu dalam penelitian ini.

Tidak ada yang dapat penulis berikan kepada semua pihak yang membantu selain iringan doa yang tulus dan ikhlas, semoga amal baik mereka diterima dan mendapat balasan yang lebih baik dari Allah SWT.

Surabaya, 13 Maret 2018

Penulis





## DAFTAR ISI

DAFTAR GAMBAR.....	vii
<b>BAB 1 PENDAHULUAN.....</b>	<b>8</b>
1.1 Latar Belakang.....	8
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>11</b>
2.1 Karies Gigi.....	11
2.2 <i>Streptococcus mutans</i> .....	11
2.3 Proses Terjadinya Karies Gigi.....	12
2.4 Biofilm.....	13
2.5 Adherensi bakteri <i>S mutans</i> .....	15
2.6 Gula.....	16
2.6.1 Sukrosa.....	16
2.6.2 Laktosa.....	17
2.6.3 Xylitol.....	18
<b>BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....</b>	<b>20</b>
3.1 Tujuan Penelitian.....	20
3.1.1 Tujuan Umum.....	20
3.1.2 Tujuan Khusus.....	20
3.2 Manfaat Penelitian.....	20
<b>BAB 4 METODE PENELITIAN.....</b>	<b>21</b>
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian.....	21
4.2 Unit Eksperimental dan Replikasi.....	21
4.2.1 Unit Eksperimental.....	21
4.2.2 Replikasi.....	21
4.3 Variabel Penelitian.....	23
4.3.1 Variabel Tergantung.....	23
4.3.2 Variabel Bebas:.....	23
4.3.3 Variabel Kendali:.....	23
4.3.4 Definisi Operasional Variabel :.....	23
4.4 Lokasi dan waktu Penelitian.....	24
4.5.1 Alat Penelitian.....	24
4.5.2 Bahan Penelitian.....	24
4.6 Prosedur Penelitian.....	25
Tahap Persiapan.....	25
4.7 Uji Pembentukan Biofilm.....	26
4.8 Uji Adherensi Biofilm <i>S mutans</i> .....	27
4.9 Alur Penelitian.....	28
4.9.1 Uji Pembentukan Biofilm.....	28
4.9.2 Uji Adherensi Biofilm.....	30
Analisis Data.....	31
<b>BAB 5 HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI.....</b>	<b>32</b>
1. Pembentukan Biofilm <i>S mutans</i> setekah dipapar sukrosa 5%, laktosa 8% dan xylitol 1%.....	32

<b>2. Adherensi Biofilm S mutans setekah dipapar sukrosa 5%, laktosa 8% dan xylitol 1%.....</b>	<b>33</b>
<b>BAB 6 RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA .....</b>	<b>35</b>
<b>BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>36</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>37</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>39</b>



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1 Kolonisai S mutans .....	13
-----------------------------------	----



## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Prevalensi karies gigi anak di Indonesia mengacu pada Riset Kesehatan Dasar yang dilakukan oleh Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan RI tahun 2013, prevalensi nasional masalah gigi dan mulut adalah 25,9 % , sebanyak 14 provinsi mempunyai masalah gigi dan mulut diatas angka nasional. Indek DMF-T menggambarkan tingkat keparahan kerusakan gigi ini meningkat seiring dengan bertambahnya umur. Prevalensi nasional Indeks DMF-T adalah 4,6. Sebanyak 15 provinsi memiliki prevalensi diatas prevalensi nasional. Indek DMF-T perempuan (5,0) lebih tinggi dari dibanding laki-laki (4,1) (Risksdas Kemenkes, 2013).

WHO (2010) mencanangkan anak umur 5 tahun 90% bebas karies, anak umur 12 tahun mempunyai tingkat keparahan kerusakan gigi DMF-T sebesar 1 gigi, penduduk umur 18 tahun bebas gigi yang dicabut, penduduk umur 35-44 tahun minimal 20 gigi berfungsi 90% dan penduduk umur 35-44 tanpa gigi (edentulous) 2%, penduduk umur 65 tahun keatas masih berfungsi 75% dan penduduk tanpa gigi 5%.

Didalam rongga mulut manusia terdapat berbagai macam mikroorganisme, baik berupa flora normal maupun patogen. Bakteri rongga mulut berkembang dengan komposisi dan struktur spesies yang kompleks untuk mempertahankan perlekatannya pada suatu permukaan. Setiap bakteri mempunyai kemampuan pertahanan diri untuk kelangsungan hidupnya dari

perubahan lingkungannya, seperti paparan bahan kimia, tekanan fisik, dan radiasi. Adapun salah satu bentuk pertahanan bakteri adalah dengan pembentukan biofilm. (Krzyściak et al. 2014; Abdallah et al. 2014).

Biofilm adalah kumpulan sel mikroorganisme, khususnya bakteri, yang melekat di suatu permukaan biologis ataupun benda mati dan diselimuti oleh pelekat karbohidrat yang dikeluarkan oleh bakteri. Biofilm merupakan perangkap nutrisi untuk pertumbuhan populasi mikroorganisme dan membantu mencegah lepasnya sel-sel dari permukaan benda hidup ataupun benda mati pada sistem yang mengalir. Permukaan tempat perlekatan biofilm merupakan habitat yang penting bagi mikroorganisme karena nutrisi dapat terperangkap pada permukaan tersebut sehingga kandungan nutrisi dapat lebih tinggi daripada di dalam cairan (Nishimura et al. 2012)

Sukrosa maupun Laktosa merupakan disakarida yang dapat difermentasi dan merupakan substrat untuk sintesis polisakarida ekstraseluler. Perubahan dalam lingkungan lokal di permukaan gigi yang disebabkan oleh paparan sukrosa, dapat mengganggu keseimbangan mikroba dan meningkatkan pertumbuhan populasi asidogenic termasuk *Streptococcus mutans*, *Actinomyces* dan *Lactobacilli*. Mengganti pemanis tambahan untuk gula yang bersifat kariogenik merupakan cara penting untuk mencegah karies dalam perawatan kebersihan mulut, mirip dengan pengobatan kemoterapi dan fluoridasi. Poliols xylitol tidak dapat dimetabolisme menjadi asam oleh mikroorganisme rongga mulut sebagai pembangkit energy (Botelho et al., 2016).



Upaya pencegahan karies gigi telah dilakukan dengan berbagai upaya, salah satunya dengan mengkonsumsi laktosa. Laktosa adalah disakarida yang berasal dari galaktosa dan glukosa dan biasanya ditemukan pada susu. Laktosa adalah disakarida yang berasal dari galaktosa dan glukosa dan banyak ditemukan pada makanan yang mengandung susu. Laktosa difermentasi sangat cepat oleh *Streptococcus mutans* dalam rongga mulut (Hinds *et al.*, 2016).

Pencegahan karies juga dilakukan di seluruh dunia dengan menggunakan *sugar substitute* yang diharapkan dapat menekan karies gigi. *Sugar substitute* yang digunakan biasanya merupakan jenis gula alkohol, seperti manitol, sorbitol, dan xylitol. Xylitol dapat menurunkan kejadian karies dengan cara meningkatkan flow saliva, menaikkan pH mulut, menekan jumlah bakteri kariogenik, menurunkan plak gigi. Namun, efek dari xylitol terhadap bakteri *Streptococcus mutans* masih perlu diteliti lebih lanjut karena berdasar penelitian sebelumnya menunjukkan hasil yang berbeda. (Nayak *et al.*, 2014; Decker *et al.*, 2014).

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA



#### 2.1 Karies Gigi

Karies gigi adalah penyakit infeksi multifaktorial, yang terjadi oleh karena adanya interaksi antara flora mulut, gigi dan faktor makanan. Keberadaan karbohidrat dalam jumlah dan frekuensi yang sering, menyebabkan *S. mutans* dalam rongga mulut memproduksi asam laktat dalam jumlah yang banyak pula sehingga lingkungan dalam biofilm yang ada di permukaan gigi menjadi sangat asam. Bila pH plak tetap berada di bawah titik kritis, ( $\pm$  pH 5.5), maka keseimbangan antara remineralisasi dan demineralisasi enamel akan terganggu. Kondisi asam yang cukup lama pada plak, akan mengakibatkan larutnya mineral sampai pada hilangnya struktur kristal sehingga gigi akan rusak permanen dan terjadi karies gigi (Ferrazzano *et al.*, 2011; Moynihan and Kelly, 2014; Sheiham and James, 2015).

#### 2.2 *Streptococcus mutans*

*Streptococcus mutans* termasuk kelompok *Streptococcus viridans* yang merupakan anggota floral normal rongga mulut yang memiliki sifat  $\alpha$ -hemolitik dan komensal oportunistik (Cai *et al.*, 2016). Pada tahun 1924, J. Clarke mengisolasi organisme dari lesi karies dan menyebutnya *Streptococcus mutans*, karena sel berbentuk oval yang diamati adalah bentuk mutan dari streptokokus (Clarke, 1924). Namun, pada akhir 1950-an *S mutans* baru menjadi perhatian dari komunitas ilmiah dan pada pertengahan 1960-an ditetapkan sebagai bakteri utama penyebab karies gigi (Loesche, 1986).

Dalam dua dekade berikutnya, para peneliti mulai mengungkap patofisiologi *S mutans*. Hasil dari penelitian ini dapat menunjukkan sifat virulensi *S mutans* yaitu : (i) kemampuan menghasilkan sejumlah besar asam organik (asam asetat) dari metabolisme karbohidrat; (ii) kemampuan untuk bertahan hidup pada pH rendah (*aciduricity*); dan (iii) kemampuan untuk mensintesis *glucan*-homopolimer ekstraseluler dari sukrosa, yang berperan dalam adesi, kolonisasi dan akumulasi biofilm pada permukaan gigi (Lemos *et al.*, 2013).

*Streptococcus mutans* merupakan bakteri yang memiliki kecenderungan berbentuk kokus dengan formasi rantai panjang apabila ditanam pada medium yang diperkaya seperti pada *Brain Heart Infusion* (BHI) Broth, sedangkan bila ditanam di media agar akan memperlihatkan rantai pendek dengan bentuk sel tidak beraturan. *Streptococcus mutans* tumbuh dalam suasana fakultatif anaerob (Cavalcanti *et al.*, 2016).

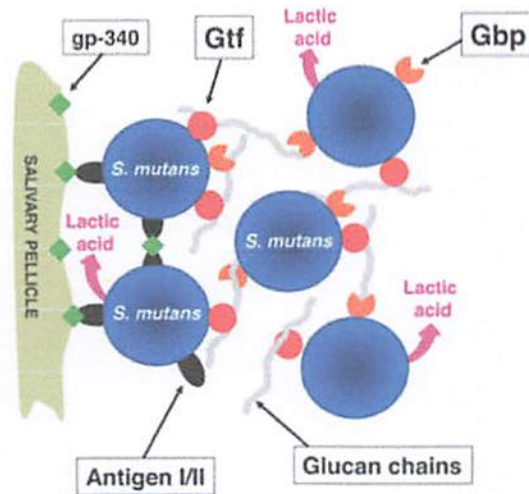
*S mutans* bersifat asidogenik yaitu menghasilkan asam dan mampu tinggal pada lingkungan asam, dan menghasilkan suatu polisakarida yang lengket yang disebut dengan dextran. Oleh karena kemampuan ini, *S mutans* bisa melekat dan mendukung pertumbuhan bakteri asidurik lainnya menuju ke enamel dan pada akhirnya mengakibatkan larutnya enamel gigi (Díaz *et al.*, 2016).

### 2.3 Proses Terjadinya Karies Gigi

*S mutans* berkoloni pada permukaan keras yang ada di rongga mulut, sedangkan spesies streptokokus lainnya dapat berkoloni pada permukaan mukosa dan permukaan enamel. Proses kolonisasi dapat dibagi menjadi tiga



fase: (i) perlekatan sel bakteri terhadap pelikel saliva, (ii) pembentukan mikrokoloni yang mengekspresikan *signal* molekul dan substansi polimer ekstraselular, dan (iii) akumulasi bakteri yang diikat oleh polisakarida (dan glikoprotein saliva) (Gambar 1).



Gambar 1 Kolonisasi *S mutans*

Gambar 2.1. Kolonisasi *S mutans*

Streptokokus menempel pada glikoprotein saliva (*gp-340*) yang ada permukaan gigi. Dengan adanya sukrosa, enzim *glucosiltransferase* (*Gtfs*) menghasilkan *glucan* dan terikat pada permukaan streptokokus oleh protein pengikat *glucan* (*Gbps*). Pada model hewan, enzim *GtfB* dan *GtfC* dan *GbpA* dan *C* sangat penting untuk pembentukan biofilm dan perkembangan karies (Quivey *et al.*, 2014).

## 2.4 Biofilm

Biofilm adalah suatu komunitas sel bakteri yang terstruktur dan saling menempel, bakteri-bakteri tersebut mampu memproduksi matriks polimer dan mampu melekat pada permukaan biologis maupun benda mati serta diselimuti oleh karbohidrat. Formasi ini membuat bakteri pembuat biofilm mampu bertahan terhadap lingkungan ekstrim yang membahayakan bakteri tersebut (Esteban Florez *et al.*, 2016).

*S mutans* merupakan bakteri yang paling mendominasi dan diduga sebagai penyebab utama karies gigi karena dapat membentuk biofilm. Pada prinsipnya dalam pembentukan biofilm dibutuhkan 3 hal, yaitu bakteri, glikokalik, dan permukaan luar sel bakteri. Apabila salah satu dari ketiganya tidak ada, maka biofilm tidak akan terbentuk. Biofilm dapat menjadi sangat sulit untuk dimatikan karena adanya material glikokalik. Banyak infeksi persisten yang terjadi di dalam tubuh disebabkan oleh biofilm bakteri. Salah satunya adalah plak gigi yang dibentuk oleh glikokalik yang dihasilkan oleh *Streptococcus mutans* (Edlund *et al.*, 2013).

Contoh sederhana biofilm adalah plak gigi. Dari beberapa studi menjelaskan bahwa bakteri di dalam mulut mempunyai hubungan yang sangat kuat dengan satu sama lain, dan dalam banyak kasus, biofilm tampaknya memiliki struktur yang sangat teratur. Adanya hubungan yang spesifik di antara berbagai spesies bakteri, dan adanya adesi permukaan yang memungkinkan kelompok spesies untuk berkolonisasi pada jaringan yang sama dan untuk melekat satu sama lain dengan afinitas yang tinggi (Lamont *et al.*, 2006)

Kata 'plak' dalam gigi pertama kali digunakan oleh Black [1886] ketika menggambarkan akumulasi beberapa mikroorganisme pada awal karies. Plak gigi merupakan biofilm, yaitu sekelompok mikroorganisme yang tertanam dalam matriks yang menempel pada permukaan gigi. Semua biofilm memiliki setidaknya satu substansi yang sama, yaitu adanya matriks dalam bakteri. Tidak ada biofilm tanpa matriks ekstraseluler polisakarida (*EPS*. Setiap biofilm mempunyai protein dengan berat molekul tertentu. Berat molekul protein pada biofilm dapat dijadikan target dalam menentukan protein spesifik biofilm, yang dapat dijadikan sebagai kandidat biomarker suatu penyakit) (Flemming Hans-Kurt, 2010; Olsen, 2015).

Pembentukan biofilm merupakan sebuah proses dinamis yang kompleks. Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa biofilm dapat terbentuk dalam berbagai ekosistem dengan mekanisme pembentukan yang sama. Lapisan perlekatan biasanya mengandung air lemak, albumin matriks polimer

ekstraseluler, atau nutrisi lain yang berasal dari lingkungan sekitar (Fotococcus Mutans, 2012).

Pembentukan biofilm merupakan proses fisiologis pada permukaan keras dalam rongga mulut dan dapat dikontrol pembentukannya dengan menyikat gigi secara teratur untuk mencegah karies gigi. Menurut definisi, biofilm adalah *matrix* yang merupakan tempat komunitas bakteri dimana bakteri melekat pada permukaan dan melekat satu sama lain. Bakteri yang terdapat dalam biofilm lebih tahan terhadap antimikroba dibandingkan dalam bentuk tunggal (Flemming, 2016).

## 2.5 Adherensi bakteri *S mutans*

Adherensi *S mutans* dalam plak gigi melalui jalur *sucrose independent* dan *sucrose dependent*. Adherensi *sucrose independent* dalam komponen saliva yang didapatkan pada acquired pellicle pada enamel berperan dalam proses perlekatan, sedangkan adherensi *sucrosa dependent* berperan dalam kolonisasi bakteri pada permukaan gigi. Asupan sukrosa merupakan salah satu faktor yang berhubungan dengan level kolonisasi. Kemampuan *S mutans* untuk mensintesis glukosa dari sukrosa meningkatkan adherensi dan meningkatkan jumlah *S. mutans* dalam plak gigi. Dengan demikian, adherensi *sucrosa dependent* berperan penting dalam memulai perubahan ekologi plak yang dapat menyebabkan karies gigi (W Krzyściak *et al.*, 2014)

Adherensi *sucrosa-independent S mutans* diduga sangat dipengaruhi oleh antigen I / II, protein permukaan 185kDa. Protein serupa yang ditemukan pada banyak streptokokus oral dan telah diberi beberapa nama termasuk P1, SPAP, Sr, PAC, dan antigen B. Protein dalam antigen I / II mempunyai kesamaan struktural sesuai dengan asam amino, meskipun ada beberapa variable yang mempengaruhi seperti aglutinin saliva, komponen pelikel saliva, dan bakteri plak lainnya (W Krzyściak *et al.*, 2014).



## 2.6 Gula

Gula mencakup semua monosakarida (glukosa, galaktosa, fruktosa) dan disakarida (sukrosa, maltosa, laktosa). Seluruh gula termasuk monosakarida dan disakarida secara alami ada dalam makanan dan ada yang ditambahkan ke makanan. Istilah tambah gula, maksudnya ditambahkan pada monosakarida dan disakarida seperti madu, sirup (misalnya, sirup jagung fruktosa tinggi, sirup maple), dan mineral. Gula alami termasuk gula yang ditemukan dalam struktur seluler biji-bijian, buah-buahan, dan sayuran ditambah yang secara alami ada dalam susu dan produk susu. Gula yang ada secara alami dalam biji-bijian, buah utuh, dan sayuran dan juga dalam susu tidak memberikan pengaruh dalam perkembangan karies gigi (atau penyakit tidak menular lainnya), karena adanya kandungan serat, kandungan air, dan faktor pelindung lainnya seperti senyawa polifenol atau kalsium atau keduanya. Konsumsi buah, sayuran, dan biji-bijian memberikan rangsangan mekanik aliran saliva dapat membantu mengurangi potensi risiko gula. Selain gula alami, ada gula bebas dalam bentuk monosakarida dan disakarida yang ditambahkan ke dalam makanan oleh produsen, proses memasak, atau konsumen ditambah gula yang secara alami ada dalam madu, sirup, dan jus buah. Asupan gula bebas ini yang harus dibatasi sebagai alasan kesehatan (Moynihan, 2016).

### 2.6.1 Sukrosa

Karies gigi, penyakit yang terkait dengan biofilm, berhubungan dengan keberadaan bakteri kariogenik dan konsumsi tinggi diet karbohidrat. Di antara diet karbohidrat, sukrosa dapat menyebabkan perubahan biokimia dan fisiologis utama

selama pembentukan biofilm gigi dan dianggap sebagai salah satu karbohidrat yang paling kariogenik. Fermentasi sukrosa oleh bakteri oral dapat dengan cepat menurunkan pH dalam biofilm gigi, yang menghasilkan pergeseran keseimbangan mikroflora menjadi lebih kariogenik. Sukrosa juga berfungsi sebagai substrat untuk sintesis polisakarida dalam biofilm gigi, terutama polisakarida ekstraseluler (*EPSs*). Selain itu, penelitian terbaru menunjukkan bahwa sukrosa dapat mengurangi konsentrasi kalsium (Ca), fosfor anorganik (Pi), dan fluoride (F) dalam biofilm gigi; yaitu ion penting dalam demineralisasi dan remineralisasi enamel dan dentin di lingkungan mulut. Di antara bakteri kariogenik, *S mutans* merupakan bakteri penyebab karies gigi. Bakteri ini dapat menghasilkan sejumlah besar asam dan bertahan hidup di lingkungan pH rendah. Selanjutnya, *S mutans* dapat menggunakan sukrosa untuk mensintesis *EPS*, yang sebagian besar merupakan glukukan yang disintesis oleh *glucosyltransferases (GTFs)*. Bakteri menghasilkan setidaknya tiga *Gtf* (*Gtf B*, *Gtf C*, dan *Gtf D*), dan mensintesis campuran  $\alpha$  (1-3) terkait dengan glukukan yang tidak larut dan  $\alpha$  (1-6) glukukan yang larut. *EPS*, terutama *EPS* yang tidak larut dalam air, dapat meningkatkan adhesensi dan akumulasi sejumlah besar streptokokus kariogenik pada permukaan gigi, yang berkontribusi pada pembentukan biofilm kariogenik (Cai *et al.*, 2016).

### 2.6.2 Laktosa

Laktosa adalah disakarida yang berasal dari galaktosa dan glukosa dan umumnya ditemukan dalam makanan kaya susu. Laktosa cepat difermentasi oleh *S mutans* dalam rongga mulut. Penelitian pada gigi hamster dengan diet bergula termasuk sukrosa, fruktosa, glukosa, atau laktosa didapatkan karies gigi yang

progresif pada hamster diet sukrosa. Fruktosa, laktosa, dan glukosa juga menyebabkan kerusakan gigi tetapi tidak separah diet dengan sukrosa.

Pada Air Susu Ibu tidak banyak pertumbuhan bakteri. Gula yang dominan dalam susu sapi dan Air Susu Ibu lebih banyak mengandung laktosa daripada sukrosa. Laktosa tidak menurunkan nilai pH secara drastis seperti sukrosa (Hinds *et al.*, 2016).

### 2.6.3 Xylitol

Xylitol, sebuah poliol gula lima karbon yang terbentuk secara alami, adalah karbohidrat kristal putih yang dikenal sejak seabad lalu. Ditemukan secara alami dalam buah, sayuran, dan buah dan dibuat secara artifisial dari bahan tanaman kaya xylan seperti birch dan beechwood. Penelitian tentang pengaruh xylitol terhadap karies gigintelah dipelajari selama 40 tahun terakhir. Sejak penelitian yang dilakukan di Turku, Finlandia, mengevaluasi efektivitas xylitol pada pengurangan plak gigi pada tahun 1970, xylitol secara global diterima sebagai pemanis alami yang disetujui oleh Badan Pengawasan Obat dan Makanan AS (FDA) dan Akademi Kedokteran Gigi Anak Amerika (*American Academy of Pediatric Dentistry*)

Xylitol menurunkan kejadian karies gigi dengan meningkatkan aliran saliva dan pH dan mengurangi jumlah bakteri *S mutans* dan bakteri periodontal (*Helicobacter pylori*), plak, xerostomia, peradangan gingiva, dan erosi gigi. Xylitol ditoleransi dengan baik oleh tubuh manusia sebagai pemanis, tetapi tingkat penyerapannya di usus kecil sangat lambat. Kelebihan xylitol diketahui menyebabkan diare osmotik, menandakan ada batas atas dosis yang dapat



ditoleransi. Penghambatan optimal dari pertumbuhan *S mutans* oleh xylitol terjadi dengan mengonsumsi 5–6 g dengan frekuensi tiga kali atau lebih per hari. Sampel plak dari pengguna xylitol menunjukkan penurunan yang signifikan dalam kelengketan plak dan polisakarida ekstraseluler yang tidak larut yang diproduksi oleh *S mutans* bila dibandingkan dengan mereka yang tidak mengonsumsi xylitol sama sekali (Nayak *et al.*, 2014).

## BAB 3

### TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

#### 3.1 Tujuan Penelitian

##### 3.1.1 Tujuan Umum

Menganalisis adherensi biofilm bakteri *Streptococcus mutans* setelah diinduksi sukrosa, laktosa dan xylitol.

##### 3.1.2 Tujuan Khusus

1. Menganalisis pembentukan biofilm *S mutans* setelah diinduksi sukrosa.
2. Menganalisis pembentukan biofilm *S mutans* setelah diinduksi laktosa.
3. Menganalisis pembentukan biofilm *S mutans* setelah diinduksi xylitol.
4. Menganalisis adherensi biofilm *S mutans* setelah diinduksi sukrosa.
5. Menganalisis adherensi biofilm *S mutans* setelah diinduksi laktosa
6. Menganalisis adherensi biofilm *S mutans* setelah diinduksi xylitol

#### 3.2 Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi ilmiah tentang pembentukan biofilm *S mutans* setelah diinduksi sukrosa, laktosa dan xylitol
2. Memberikan informasi ilmiah tentang adherensi biofilm *S mutans* setelah diinduksi sukrosa, laktosa dan xylitol

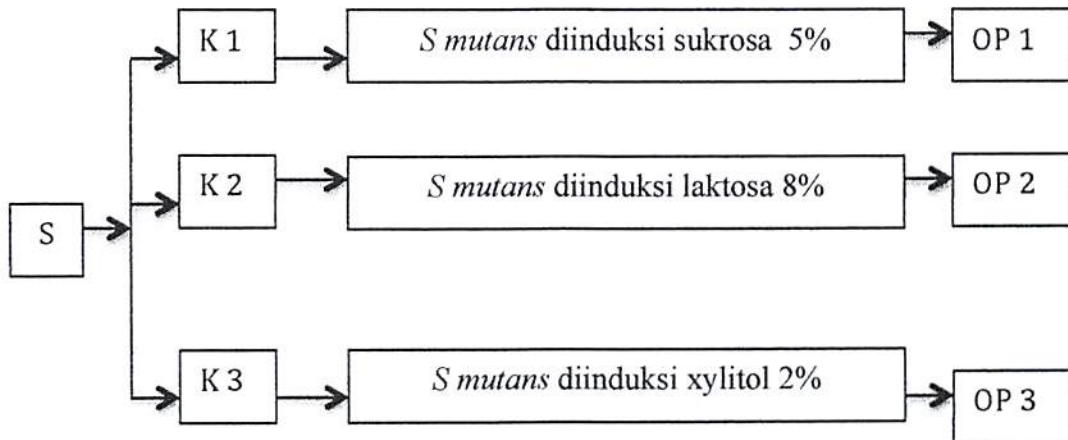


## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah *true experimental laboratories* dengan rancangan *post test only group design*.



S : Subyek penelitian

K 1 : Kelompok *S mutans* diinduksi sukrosa 5%

K 2 : Kelompok *S mutans* diinduksi laktosa 8%

K 3 : Kelompok *S mutans* diinduksi xylitol 8%

OP 1: Observasi pada kelompok 1

OP 2: Observasi pada kelompok 2

OP 3: Observasi pada kelompok 3



#### 4.2 Unit Eksperimental dan Replikasi

##### 4.2.1 Unit Eksperimental

Unit eksperimental adalah bakteri *S mutans* ATCC 25175

##### 4.2.2 Replikasi

Pada penelitian ini, jumlah replikasi yang akan diteliti dihitung dengan menggunakan Lemeshow, *et al*, 1990.

$$r = 2 \frac{2 (Z\alpha + Z\beta) SD^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$$

$r$  = jumlah replikasi setiap kelompok

$SD$  = standar deviasi dari respon kelompok kontrol (=0,60)

$Z\alpha$  = nilai distribusi normal standar yang besarnya tergantung  $\alpha$

$$(\alpha = 0,05, Z\alpha = 1,64)$$

$Z\beta$  = nilai standar yang besarnya tergantung  $\beta$  ( $\beta = 0,10, Z\beta = 1,28$ )

$\mu_1$  = rerata kelompok perlakuan

$\mu_2$  = rerata kelompok kontrol

$$r = 2 \frac{2 (1,64 + 1,28) 0,60^2}{(5,81 - 6,48)^2}$$

= 4,683 dibulatkan menjadi 5

Dari rumus diatas didapatkan jumlah replikasi minimal per kelompok sebanyak 5. Untuk mengatasi kemungkinan kegagalan dilakukan penambahan faktor koreksi (f) sebesar 10%, sesuai dengan rumus Higgins :

$$\frac{1}{1-0,1} \times r = 5,5$$

sehingga dan dibulatkan menjadi 6 pada setiap

kelompok perlakuan.

### 4.3 Variabel Penelitian

#### 4.3.1 Variabel Tergantung

1. Biofilm *S mutans*

#### 4.3.2 Variabel Bebas:

Sukrosa

Laktosa

Xylitol

#### 4.3.3 Variabel Kendali:

- a. Bakteri *S mutans*
- b. Cara kerja penelitian
- c. Alat dan bahan penelitian
- d. Metode pemeriksaan

#### 4.3.4 Definisi Operasional Variabel :

1. Biofilm bakteri *S mutans* adalah lapisan yang mengandung *glucan* yang dihasilkan bakteri karena adanya paparan sukrosa pada media *TYC*.
2. Bakteri *Streptococcus mutans* merupakan bakteri gram positif berbentuk bulat berantai dengan diameter 0,5-0,7 mm, bakteri yang tidak bergerak aktif (non motil) dan termasuk bakteri an aerob fakultatif.
3. Sukrosa merupakan karbohidrat yang terdiri dari dua monoskarida (disakarida) yaitu glukosa dan fruktosa.



4. Xylitol dikenal sebagai gula alkohol atau monosakarida polyol. Xylitol memiliki rasa yang manis seperti gula biasa (sukrosa).
5. Laktosa adalah bentuk disakarida dari karbohidrat yang banyak terkandung di dalam susu dan mempunyai potensi kariogenik yang kecil.
6. Adherensi bakteri adalah perlekatan yang terjadi antara biofilm yang dibentuk oleh *S mutans* setelah diinduksi menggunakan sukrosa 5% , laktosa 8% dan xylitol 2 %.

#### 4.4 Lokasi dan waktu Penelitian

Pusat Riset Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya, Laboratorium Science dan Tehnologi Universitas Malang selama 3 bulan.

#### 4.5 Alat dan Bahan

##### 4.5.1 Alat Penelitian

- Centrifuge
- Incubator
- Mikropipet
- Tabung reaksi
- Microtiter plate
- SEM
- *Glass coverslips*
- *12-well cell culture plate*

##### 4.5.2 Bahan Penelitian

- Kultur bakteri *Streptococcus mutans*

- Sukrosa 5%
- Xylitol 1%
- Media BHIB (*Brain Heart Infusion Broth*)
- Dye (Crystal violet)
- Formalin
- Sodium asetat
- Air steril
- Larutan NaOH 0,5M
- Larutan saline
- PBS
- Etanol absolute
- Glutaraldehyde 2,5%

#### 4.6 Prosedur Penelitian

##### Tahap Persiapan

##### 1. Sterilisasi Instrument

Sebelum digunakan dalam penelitian, seluruh alat disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121° dan tekanan 1,5 atm.

##### 2. Pemiakan Bakteri

Pemiakan bakteri dilakukan untuk memperbanyak bakteri *S mutans* dengan cara menginokulasikan 1 ose biakan murni bakteri *S mutans* ke dalam media *Brain Heart Infusion Broth (BHIB)*

kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam didalam inkubator.

#### 4.7 Uji Pembentukan Biofilm

Bakteri dikultur menggunakan media *BHIB* (kontrol), media *BHIB* dengan sukrosa 5% dan media *BHIB* dengan xylitol 1% dan media laktosa 8% pada *glass coverslips* yang dimasukkan ke dalam *12-well cell culture plate* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, *coverslips* diambil kemudian dicuci sebanyak tiga kali menggunakan PBS steril. Fiksasi biofilm dilakukan menggunakan *glutaraldehyde* 2,5% dalam larutan PBS (pH 7,4) dengan *formaldehyde* 2% selama satu malam. Setelah difiksasi, bilas *glass coverslips* menggunakan PBS dan didehidrasi dalam etanol absolute. Sampel kemudian dikeringkan, dilapisi dengan emas dan diobservasi menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM) (Hitachi S-3000 N; High Technology Operation, Japan).

Bakteri *S mutans* ( $10^5$ - $10^6$  CFU mL<sup>-1</sup>) yang sudah dikultur dalam media *BHIB*, *BHIB* dengan sukrosa 5%, dan *BHIB* dengan xylitol 1% selama satu malam pada suhu 37°C, diambil masing-masing 50µL dan dimasukkan ke dalam mikrotiter. Inkubasi bakteri selama 24 jam pada suhu 37°C, kemudian buang media dan sel-sel yang tidak menempel pada mikrotiter. Sel-sel planktonik dibilas menggunakan air steril. *Well* yang berisi sel-sel yang menempel (biofilm) difiksasi menggunakan formalin (37%, pengenceran 1:10) dan sodium asetat 2%. Setiap *well* diwarnai menggunakan 200µL Crystal Violet 0,1% selama

15 menit pada suhu ruang. Menghilangkan pewarna dengan menggunakan 100 $\mu$ L alcohol 95% setelah dibilas dua kali menggunakan air steril. Mikroplates diletakkan di dalam shaker kemudian *dishake* selama 10 menit. Pembentukan biofilm yang terbentuk diukur dengan cara mengukur *optical density* dari suspensi yang terbentuk menggunakan *microplate reader* (BIORAD iMark TM Microplate Reader) dengan panjang gelombang 625 nm.

#### 4.8 Uji Adherensi Biofilm *S mutans*

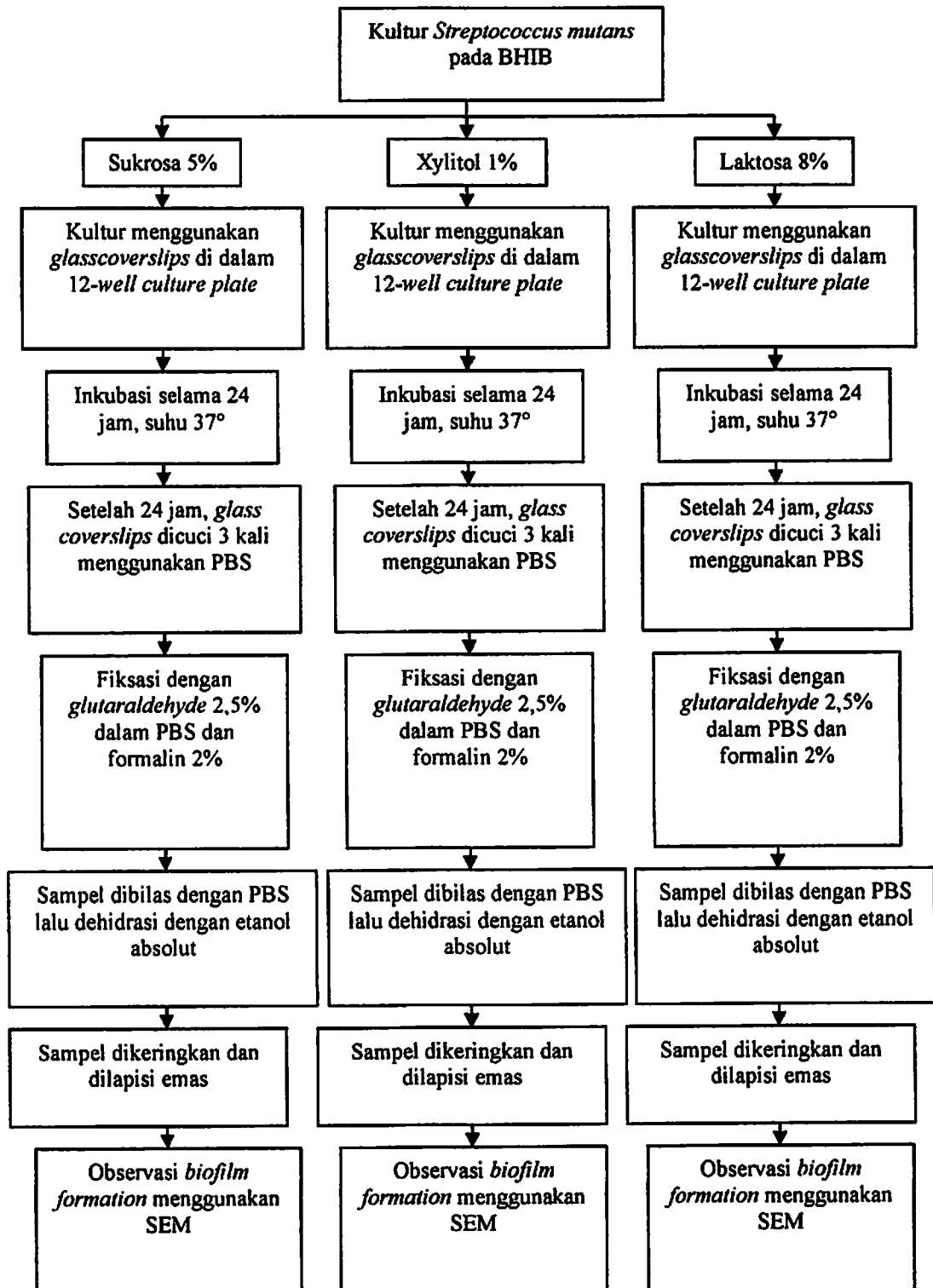
Bakteri dikultur menggunakan media BHIB dengan kemiringan 30° pada suhu 37°C selama 24 jam di dalam tabung reaksi. Tabung A berisi kultur yang dibiakkan dalam *BHIB* saja sebagai control penelitian, tabung S berisi kultur yang dibiakkan dalam *BHIB* dengan campuran sukrosa 5%, tabung X berisi kultur yang dibiakkan dalam *BHIB* dengan campuran xylitol 1%, tabung Y berisi kultur yang dibiakkan dalam *BHIB* dengan campuran laktosa 8 %. Kultur kemudian dituang secara perlahan dari tabung reaksi. Sel yang menempel pada permukaan tabung dihilangkan menggunakan NaOH 0,5M kemudian disentrifus. Setelah itu, sel dicuci dan direndam dalam larutan garam dan perlekatannya dilihat menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm (Hasan *et al.*, 2015)

$$\text{Persen adherensi} = (\text{O.D sel menempel} / \text{O.D total sel}) \times 100$$

## 4.9 Alur Penelitian

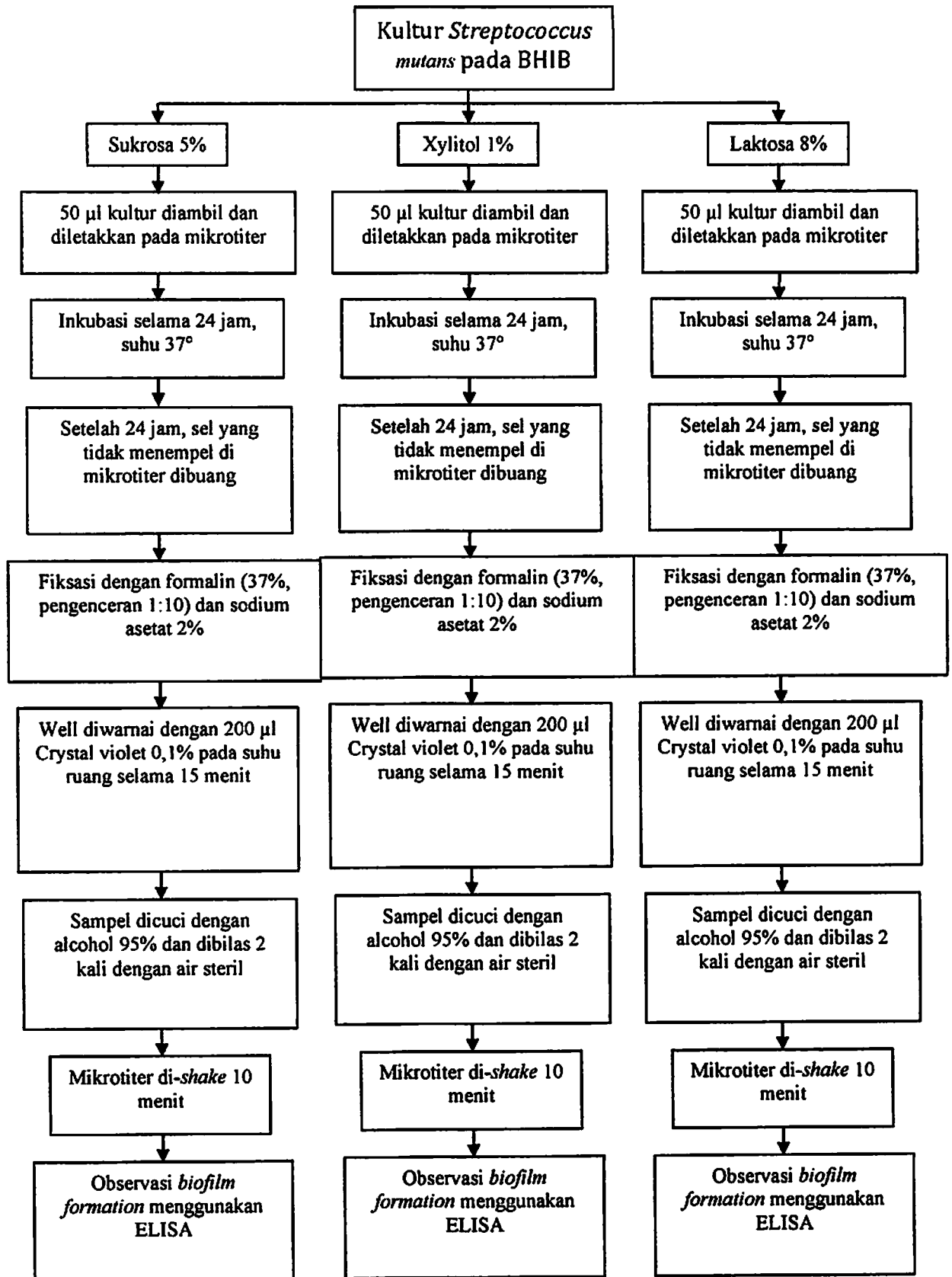
### 4.9.1 Uji Pembentukan Biofilm

#### a. Menggunakan SEM

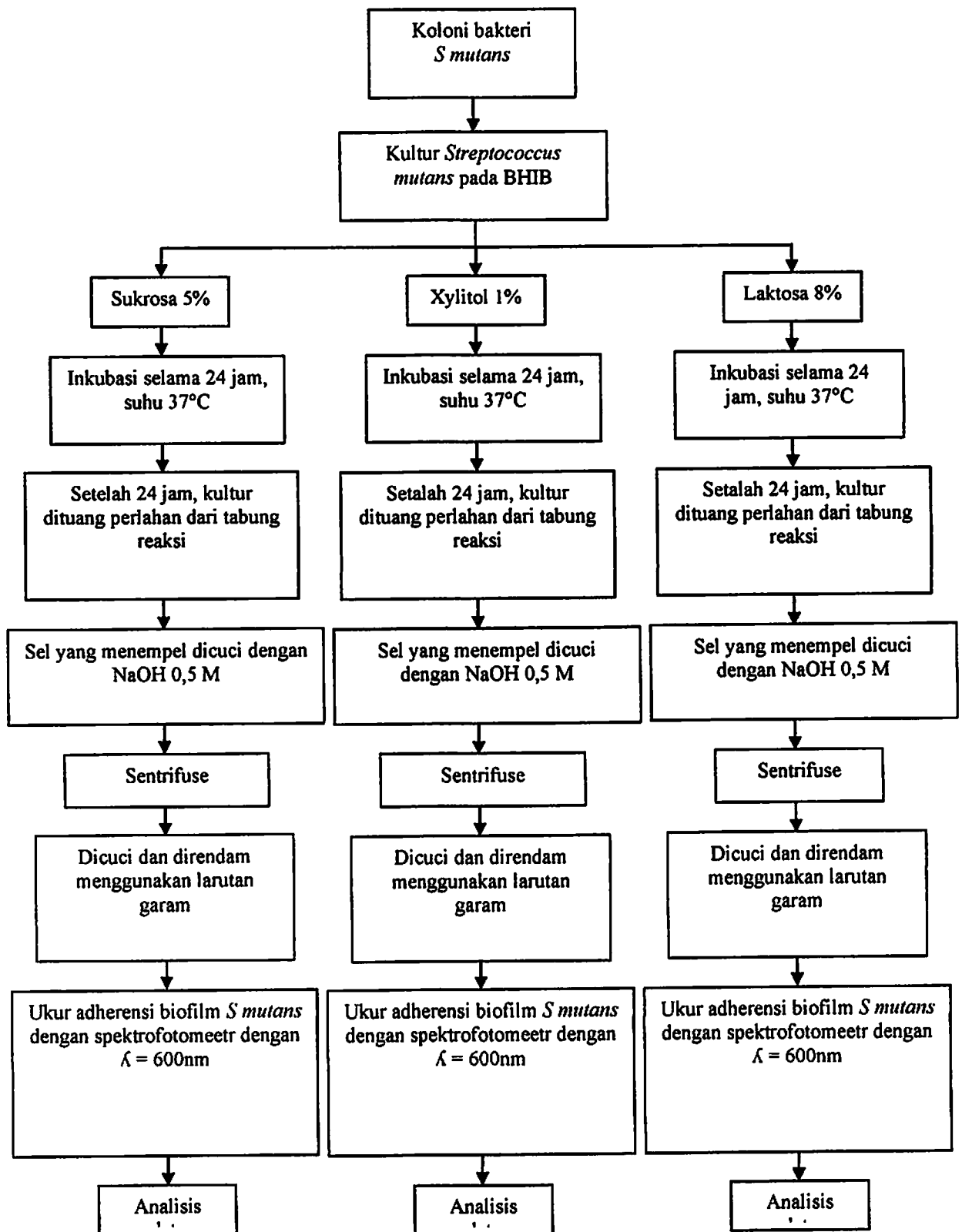




## b. Menggunakan ELISA



## 4.9.2 Uji Adherensi Biofilm



### **Analisis Data**

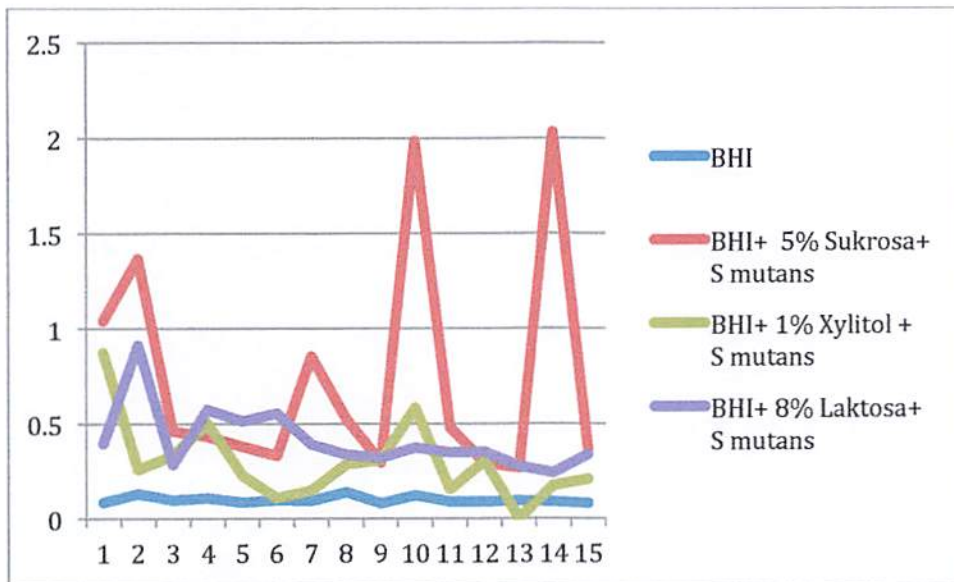
Analisis data dilakukan untuk melihat apakah terdapat perbedaan yang signifikan pada masing-masing tabung reaksi yang berisi media BHIB, BHIB dengan sukrosa 5%, BHIB dengan xylitol 1%, BHIB dengan campuran antara sukrosa 5% dan xylitol 1%. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan Anova Nilai p dianggap signifikan apabila nilai  $p < 0,0$

## BAB 5

### HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

#### 1. Pembentukan Biofilm *S mutans* setelah dipapar sukrosa 5%, laktosa 8% dan xylitol 1%

Pengamatan pembentukan biofilm *S mutans* yang dipapar dengan sukrosa 5%, laktosa 8% dan xylitol 1% dari hasil pembacaan Elisa Reader dengan panjang gelombang 625 nm dengan nilai absorbansi atau Optical Density (OD). Nilai OD mengindikasikan adanya pertumbuhan biofilm bakteri (Gambar1)



Gambar 1. Pembentukan Biofilm *S mutans* setelah dipapar dengan sukrosa 5%, laktosa 8% dan xylitol 1% dan BHI sebagai kontrol

Pembentukan biofilm bakteri *S mutans* yang dipapar sukrosa 5%, laktosa 8% dan xylitol 1% dengan uji statistik Anova menunjukkan perbedaan yang bermakna ( $p < 0,05$ ). Rata-rata dan Standar Deviasi pembentukan biofilm *S mutans* setelah dipapar sukrosa 5% ( $0,80069 \pm 0,163460$ ) lebih tinggi dibanding dengan setelah dipapar laktosa 8% ( $0,40950 \pm 0,164126$ ) maupun setelah dipapar xylitol 1% ( $0,30250 \pm 0,196727$ ) dan kontrol BHI ( $0,09956 \pm 0,019415$ ). Dengan uji LSD,

didapatkan perbedaan yang bermakna pada pembentukan biofilm *S mutans* yang dipapar dengan sukrosa 5% dan laktosa 8%, maupun antara sukrosa 5% dan xylitol 1%, ( $p < 0,05$ ) sedangkan *S mutans* yang dipapar laktosa 8% dan xylitol 1% tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna ( $p > 0,05$ ).

## 2. Adherensi Biofilm *S mutans* setekah dipapar sukrosa 5%, laktosa 8% dan xylitol 1%

Data dari hasil penelitian yang telah dilakukan untuk melihat adherensi biofilm bakteri *Streptococcus mutans* setelah diinduksi menggunakan sukrosa 5%, laktosa 8% dan xylitol 1% dapat dilihat pada tabel 5.1 di bawah ini.

Tabel 5.1 Hasil adherensi Biofilm *Streptococcus mutans* setelah diinduksi dengan sukrosa 5%, laktosa 8% dan xylitol 1%

Adherensi Biofilm Paparan	N	Mean	Std. Deviasi
BHIB + <i>S mutans</i> (Kontrol)	6	0,2708	0,1238
BHIB + <i>S mutans</i> + 5% Sukrosa	6	0,9294	0,0431
BHIB + <i>S mutans</i> + 8% Laktosa	6	0,8274	0,4309
BHIB + <i>S mutans</i> + 1% Xylitol	6	0,5095	0,0392

Aherensi biofilm bakteri *S mutans* yang dipapar sukrosa 5%, laktosa 8% dan xylitol 1% dengan uji statistik Anova menunjukkan perbedaan yang bermakna ( $p < 0,05$ ). Dengan uji POST HOC TUKEY HSD, didapatkan perbedaan yang bermakna antara adherensi biofilm *S mutans* yang dipapar sukrosa 5% dan xylitol 1% maupun adherensi biofilm *S mutans* yang dipapar laktosa 8% dan xylitol 1%,



sedangkan adherensi biofilm *S mutans* yang dipapar dengan sukrosa 5% dan laktosa 8%, tidak didapatkan perbedaan yang bermakna ( $p>0,05$ ).

## BAB 6

### RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

Setelah pemeriksaan pembentukan biofilm *S mutans* yang terbentuk setelah dipapar 5% sukrosa, 8% laktosa dan 1 % xylitol, tahapan berikutnya adalah :

1. Analisis biofilm *S mutans* yang terbentuk setelah dipapar 5% sukrosa, 8% laktosa dan 1 % xylitol dengan menggunakan *Scanning Electron Microscope*.
2. Analisis biofilm *S mutans* setelah dipapar sukrosa 5%, laktosa 8% dan xylitol 1% dengan *Confocal Laser Scanning Microscope*.



**BAB 7****KESIMPULAN DAN SARAN**

1. Ada perbedaan pembentukan biofilm *S mutans* setelah dipapar sukrosa 5%, laktosa 8% maupun setelah dipapar xylitol 1%.
2. Pembentukan biofilm *S mutans* setelah dipapar sukrosa 5% lebih tinggi dibanding dengan setelah dipapar laktosa 8% maupun setelah dipapar xylitol 1%.
3. Ada perbedaan adherensi biofilm *S mutans* setelah dipapar sukrosa 5% , laktosa 8% maupun setelah dipapar xylitol 1%.
4. Adherensi biofilm *S mutans* setelah dipapar sukrosa 5% sama dengan setelah dipapar laktosa 8%, sedangkan adherensi biofilm *S mutans* setelah dipapar sukrosa 5% maupun laktosa 8% didapatkan perbedaan bila dipapar xylitol 1%.





## DAFTAR PUSTAKA

- Abdallah, M. *et al.*, 2014. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Archives of Microbiology*, 196(7), pp.453–472.
- Al-mudallal, N.H., Al-jumaily, E.F. & Abdul, N., Isolation and Purification of glucosyltransferase from mutans *Streptococcus Sobrinus* ( serotype G ) local isolate ., pp.10–18.
- BOTELHO, J.N. *et al.*, 2016. Enamel and dentine demineralization by a combination of starch and sucrose in a biofilm – caries model. *Brazilian Oral Research*, 30(1), pp.1–8. Available at: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1806-83242016000100250&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-83242016000100250&lng=en&tlng=en).
- Cai, J.N. *et al.*, 2016. Functional relationship between sucrose and a cariogenic biofilm formation. *PLoS ONE*, 11(6), pp.1–12.
- Cavalcanti, I.M.G. *et al.*, 2016. Interactions between *Streptococcus oralis*, *Actinomyces oris*, and *Candida albicans* in the development of multispecies oral microbial biofilms on salivary pellicle. *Molecular Oral Microbiology*.
- Clarke, J.K., 1924. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *The British Journal of Experimental Pathology*, 5(3), pp.141–147.
- Decker, E.-M. *et al.*, 2014. Metabolic activity of *Streptococcus mutans* biofilms and gene expression during exposure to xylitol and sucrose. *International journal of oral science*, 6(4), pp.195–204. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25059251>.
- Díaz *et al.*, 2016. Frequency of sucrose exposure on the cariogenicity of a biofilm-caries model. *European Journal of Dentistry*, 10(3), pp.345–350.
- Edlund, A. *et al.*, 2013. An in vitro biofilm model system maintaining a highly reproducible species and metabolic diversity approaching that of the human oral microbiome. *Microbiome*, 1(1).
- Esteban Florez, F.L. *et al.*, 2016. Real-time assessment of *Streptococcus mutans* biofilm metabolism on resin composite. *Dental Materials*, 32(10), pp.1263–1269.
- Ferrazzano, G.F. *et al.*, 2011. Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: A review. *Molecules*, 16(2), pp.1486–1507.
- Flemming, H.C. *et al.*, 2016. Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9).
- Flemming Hans-Kurt, W.J., 2010. The biofilm matrix. *Natures Reviews Microbiology*, 8.
- Fo Ptooccus Mutans, B., 2012. Biofilm Formation by *Streptococcus mutans* and Related Bacteria. *Advances in Microbiology*, 2, pp.208–215. Available at: <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2012.23025> [Accessed October 23, 2016].
- Hasan, S., Danishuddin, M. & Khan, A.U., 2015. Inhibitory effect of zingiber officinale towards *Streptococcus mutans* virulence and caries development: in vitro and in vivo studies. *BMC Microbiology*, 15(1), p.1. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/15/1>.

- Hinds, L.M. et al., 2016. Effect of Infant Formula on Streptococcus Mutans Biofilm Formation. *The Journal of clinical pediatric dentistry*, 40(3), pp.178–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27472563>.
- Jiang, S. et al., 2015. Morphological and proteomic analyses of the biofilms generated by Streptococcus mutans isolated from caries-active and caries-free adults. *Journal of Dental Sciences*, 10(2), pp.206–215. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jds.2014.09.001>.
- Keren, D.F., 2003. *Protein Electrophoresis in Clinical Diagnosis* 1st ed., London: Edward Arnold.
- Krzyściak, W. et al., 2014. The virulence of Streptococcus mutans and the ability to form biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 33, pp.499–515.
- Lemos, J.A. et al., 2013. Streptococcus mutans: A new Gram-positive paradigm? *Microbiology (United Kingdom)*, 159(PART3), pp.436–445.
- Loo, C.Y., Corliss, D. a & Ganeshkumar, N., 2000. Streptococcus gordonii Biofilm Formation: Identification of Genes that Code for Biofilm Phenotypes Streptococcus gordonii Biofilm Formation : Identification of Genes that Code for Biofilm Phenotypes. *Journal of Bacteriology*, 182(5), pp.1374–1382.
- Moynihan, P., 2016. Sugars and Dental Caries: Evidence for Setting a Recommended Threshold for Intake. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 7(1).
- Moynihan, P.J. & Kelly, S.A.M., 2014. Effect on caries of restricting sugars intake: Systematic review to inform WHO guidelines. *Journal of Dental Research*, 93(1).
- Nayak, P.A., Nayak, U.A. & Khandelwal, V., 2014. The effect of xylitol on dental caries and oral flora. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry*, 6, pp.89–94.
- Nishimura, J. et al., 2012. Biofilm Formation by Streptococcus mutans and Related Bacteria. *Advances in Microbiology*, 2(September), pp.208–215.
- Olsen, I., 2015. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 34(5).
- Quivey Robert G, JR, Koo Hyun, Lemos Jose, K.-K.D.T., 2014. Pathogenic Mechanisms in Dentak Caries. In J. H. F. Lamont Richard J, Hajjshengallis George N, ed. *Oral Microbiology and Immunology*. Washington DC: ASM Press, pp. 241–246.
- Sheiham, A. & James, W.P.T., 2015. Diet and dental caries: The pivotal role of free sugars reemphasized. *Journal of Dental Research*, 94(10).
- Smith, D.J. et al., 1994. Purification and Antigenicity of a Novel Glucan-Binding Protein of Streptococcus mutans. , 62(6), pp.2545–2552.
- Wilkins, J.C., Beighton, D. & Homer, K.A., 2003. Effect of Acidic pH on Expression of Surface-Associated Proteins of Streptococcus oralis. , 69(9), pp.5290–5296.





## LAMPIRAN

**Biofilm Formation of Streptococcus Mutans Bacteria  
After Exposure to Sucrose, Lactose and Xylitol**

Prawati Nuraini<sup>1</sup>, Soetjipto<sup>2</sup>, Indah Listiana Kriswandini<sup>3</sup>, Rini Devijanti  
Ridwan<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Pediatric Dentistry Department, Faculty of Dental Medicine Airlangga University

<sup>2</sup> Medical Biochemistry Department, Faculty of Medicine, Airlangga University

<sup>3</sup> Oral Biology Department, Faculty of Dental Medicine, Airlangga University

**ABSTRACT**

Biofilm formation is one of the strategies of *S mutans* bacteria to survive in the oral cavity. Biofilm exposure agents can be from chemicals, physical injury, and radiation including daily food intake.

The purpose of the study was to determine the biofilm formation of *Streptococcus mutans* bacteria after being exposure to 5% sucrose, 8% lactose and 1% xylitol.

Method: *S mutans* were grown in the test tubes with Tryptose Soy Broth (TSB) medium added with 1% glucose. They were put into an incubator of 37° C for 24 hours to grow the biofilms. The culture was exposed to 5% sucrose, 8% lactose and 1% xylitol, and incubated for 24 hours at 37° C, and then examined with Elisa with a wavelength of 625 nm.

Results: There were some differences in the biofilm formation of *S mutans* after exposure to 5% Sucrose, 8% Lactose, 1% Xylitol ( $p < 0.05$ ). The LSD test indicated that there were some significant differences among the biofilm formations of *S mutans* after exposure to 5% sucrose and 8% Lactose, and 5% sucrose, and 1% Xylitol, while there were no significant differences ( $> 0.05$ ) when it was exposed to 8% Lactose and 1% Xylitol.

Conclusion: The biofilm formation of *S Mutan* after exposure to 5% sucrose was the highest of all if they were compared to 8% Lactose and 1% Xylitol exposures.

**Key words :** Biofilm formation, *Streptococcus mutans*, sucrose, lactose, xylitol.

## INTRODUCTION

The prevalence of child dental caries in Indonesia refers to the Basic Health Research conducted by the Health Research and Development Agency of Indonesia in 2013. The national prevalence of dental and oral problems is 25.9%. The rate of it, however, is higher in as many as 14 provinces than that of the national figure. The DMF-T index describes that the severity of tooth decay rises along with the increasing of age. The national prevalence of the DMF-T Index is 4.6. A total of 15 provinces have a higher prevalence than that of the national figure. The Female DMF-T index (5.0) is higher than that of the male one (4.1) (Rikesdas Ministry of Health, 2013).

WHO (2010) stated that 90% of 5-year-old children were caries-free, 12-year-old children had a severity of 1 DMF-T tooth decay, 18-year-old population were free from teeth extraction, residents aged 35-44 years had at least 20 teeth with 90 % functioning and population aged 35-44 without teeth (edentulous) was 2%, population aged more than 65 years was still 75% functioning, and population without teeth was 5%.

In the human oral cavity there are various kinds of microorganisms, not only in the form of normal flora but also pathogens. The oral cavity bacteria

develop with a complex composition and species structures to maintain the adhesion to a surface. Each bacterium has the ability to self-defense for its survival from any changes in the environment, such as exposure to chemicals, physical stress, and radiation. One form of the bacterial defense is the formation of biofilm <sup>1,2</sup>.

Biofilm is a group of cells of microorganisms, especially the bacteria which attach to a biological surface and are covered by the carbohydrate adhesives released by the bacteria. Biofilm is a nutritional trap for the growth of microorganism populations and helps prevent the release of cells from the surface of living things or inanimate objects. <sup>3</sup>

Sucrose and Lactose are fermented disaccharides and are substrates for the synthesis of extracellular polysaccharides. Changes in the local environment on the tooth surface caused by the sucrose exposure can interfere with the microbial balance and increase the growth of acidogenic populations including *Streptococcus mutans*, *Actinomyces* and *lactobacilli*. Replacing additional sweeteners for cariogenic sugar is an important way to prevent the caries in oral hygiene treatments, similar to treatment of chemotherapy and fluoridation. Polyol xylitol cannot be

metabolized to acid by the oral microorganisms as an energy generator<sup>4</sup>.

Some efforts to prevent the dental caries have been carried out, and one of them is by consuming lactose. Lactose is a disaccharide derived from galactose and glucose and is usually found in milk. Formula milk is a non-breast milk food source that is consumed by the baby until he is 6 months old and can be continued because it is the main intake of the baby during the 1 year life of a child. Many parents decide to stop the breast feeding and depend on the formula milk as the nutrition. Lactose is fermented very quickly by *Streptococcus mutans* in the oral cavity<sup>5</sup>

Caries prevention is also carried out throughout the world by using the sugar substitute. It is highly expected to reduce the dental caries. Sugar substitute used is usually a type of sugar alcohol, such as mannitol, sorbitol, and xylitol. Xylitol can reduce the occurrence of caries by increasing the flow of saliva, the pH of the mouth, reducing the number of cariogenic bacteria, and the dental plaque. On the other hand, some further studies on the effect of xylitol on *Streptococcus mutans* bacteria are strongly necessary to carry out because the previous researches indicated the different results.<sup>6,7</sup>

## **MATERIALS AND RESEARCH METHODS**

### **Biofilm Formation Test**

Bacterial culture was carried out to multiply *S mutans* bacteria by inoculating 1 ose pure culture of *S mutans* bacteria into Tryptose Soy Broth (TSB) media and then it was incubated at 37° C for 24 hours in the incubator.

Bacteria were cultured by using BHIB (control) media with 5% sucrose, with 8% lactose and with 1% xylitol on the glass coverslips which were inserted into 12-well cell culture plates and incubated at 37° C for 24 hours. After 24 hours, coverslips were taken and then washed three times by using sterile PBS. Biofilm fixation was performed by using 2.5% glutaraldehyde in PBS solution (pH 7.4) with 2% formaldehyde for one night. After fixation, the glass coverslips were rinsed by using PBS and dehydrated in ethanol absolute.

*S mutans* bacteria (105-106 CFU ml<sup>-1</sup>) which have been cultured in BHIB media with 5% sucrose, with 8% lactose and with 1% xylitol for one night at 37° C, were taken respectively 50µL and put them in a microtiter. Then the bacteria were incubated for 24 hours at 37° C, after that the media and the cells that were not attached to the microtiter were removed. Next, the planktonic cells were rinsed with the sterile water. Fixation by using formalin (37%, 1:10 dilution) and 2% sodium acetate was carried for wells

containing attaching cells (biofilms). Each well was colored/dyed with 200 $\mu$ L 0.1% Crystal Violet for 15 minutes at room temperature. Then, 100 $\mu$ L of 95% alcohol was used to remove the dye after rinsing twice in sterile water. Microplates were placed in a shaker and then shaken for 10 minutes. The formation of biofilm formed was measured by measuring the optical density of the suspension formed by using a microplate reader with a wavelength of 625 nm<sup>8</sup>

## RESULTS

Observation of biofilm formation of *S mutans* exposed to 5% sucrose, 8% lactose and 1% xylitol from Elisa Reader readings with a wavelength of 625 nm with the absorbance value or Optical Density (OD). OD values indicate the growth of bacterial biofilms (Figure 1)

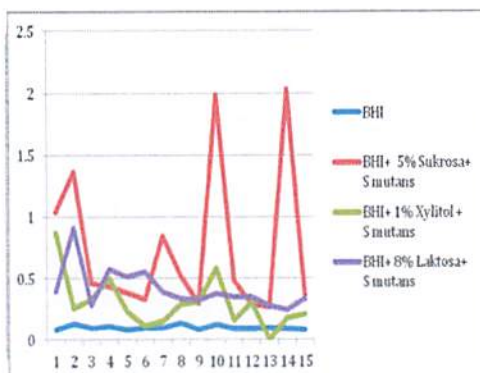


Figure 1. *S mutans* Biofilm formation after being exposed to 5% sucrose, 8% lactose and 1% xylitol and BHI as a control

The biofilm formation of *S mutans* bacteria exposed to 5% sucrose, 8% lactose and 1% xylitol with anova test indicated some significant differences ( $p < 0.05$ ). The average and Standard Deviation of *S mutans* biofilm formation after exposure to 5% sucrose ( $0,80069 \pm 0,163460$ ) was higher than after exposure to 8% lactose ( $0,40950 \pm 0,164126$ ) also after exposure to 1% xylitol ( $0,30250 \pm 0,196727$ ) and BHI control ( $0,09956 \pm 0,019415$ ). The LSD test showed that there were significant differences in *S mutans* biofilm formation exposed to 5% sucrose and 8% lactose, and 5% sucrose and 1% xylitol, ( $p < 0.05$ ) while *S mutans* exposed to 8% lactose and 1% xylitol showed no significant difference ( $p > 0.05$ ).

## DISCUSSION

Biofilms are a structured community of microbial cells attached to the surface and formed in a three-dimensional (3D) extracellular matrix.<sup>9,10</sup> They consist of some various substances of extracellular polymers, exopolysaccharides, proteins, lipids, nucleic acids, and lipooligosaccharides.<sup>11</sup> These matrices are important for biofilm development and can express the virulence of some pathogenic bacteria<sup>12</sup>.

The ability of biofilm formation

tested on several carbohydrate diets indicated that more biofilm formation was closely related to the presence of sugar. A number of studies have shown the role of sugar in the etiology of caries and the importance of sugar as the main dietary substrate that drives the caries process.<sup>13</sup>

Sucrose is a disaccharide, which is recognized as the most cariogenic sugar. When in contact with the oral cavity biofilm, sucrose is rapidly metabolized by the bacterial consortium and used as a substrate to produce large amounts of organic acids, which in turn causes a decrease in pH in the biofilm.<sup>14</sup>

Xylitol is a natural sweetener approved by the US Food and Drug Administration (FDA) and the American Academy of Pediatric Dentistry and is used as a substitute for sucrose which can cause caries. Xylitol polyols cannot be metabolized to acid by microorganisms in the oral cavity.<sup>6</sup>

Lactose, disaccharide  $\beta$ 1,4-linked, which is derived from glucose and galactose, is found in milk and many dairy products, and can be quickly fermented by the oral bacteria, including highly cariogenic bacteria *S mutans*. The population of the industrialized countries consume a diet rich in milk because it contains all the basic components needed for the development and maintenance of human life.<sup>15</sup>

In this study, the biofilm formation of *S mutans* bacteria was obtained after the exposure to 5% sucrose, 8% lactose and 1% xylitol. The results of this study were supported by the research of Cai et al (2016) and several other researchers to prove the occurrence of biofilm formation after the exposure to sucrose.  
5, 7, 14, 16, 17

The highest biofilm formation was obtained after *S mutans* was exposed to 5% sucrose compared exposure to 8% lactose and 1% xylitol. There was a significant difference in *S mutans* biofilm formation after 5% sucrose exposure compared to *S mutans* biofilm formation after 1% xylitol exposure. In contrast to Decker et al (2014), the research on biofilm samples exposed to 5% sucrose and 1% xylitol with confocal laser scanning microscopy examination showed meaningless results.

In this study the biofilm formation of *S mutans* bacteria exposed to 5% sucrose compared to 8% lactose showed significant differences, and the results of this study were supported by Hinds et al<sup>5</sup>

The biofilm formation of *Streptococcus* bacteria in the oral cavity is controlled by the carbon sources in the oral cavity environment which is characterized by a balance between free bacteria and bacteria that form colonies. Carbon catabolism plays an important

role in this balance. If there is no carbon, the bacteria will release and become planktonic.

Some previous studies on the biofilm formation of *S mutans* bacteria after exposure to 5% sucrose, 8% lactose and 2% xylitol indicated some different results. The research method applied in this study can be repeated and carried out. A further research of in vivo clinical studies is highly needed. It can be concluded that there was an *S mutans* biofilm formation after exposure to 5% sucrose, 8% lactose and 2% xylitol. The highest biofilm formation was found after *S mutans* was exposed to 5% sucrose compared to 8% lactose and 1% xylitol exposure.

## REFERENCES

1. Krzyściak W, Jurczak A, Kościelniak D, Bystrowska B, Skalniak A. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33:499–515. doi:10.1007/s10096-013-1993-7.
2. Abdallah M, Benoliel C, Drider D, Dhulster P, Chihib NE. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Arch Microbiol*. 2014;196(7):453–472. doi:10.1007/s00203-014-0983-1.
3. Nishimura J, Saito T, Yoneyama H, Bai LL. Biofilm Formation by *Streptococcus mutans* and Related Bacteria. *Adv Microbiol*. 2012;2(September):208–215. doi:aim.2012.23025.
4. BOTELHO JN, VILLEGAS-SALINAS M, TRONCOSO-GAJARDO P, GIACAMAN RA, CURY JA. Enamel and dentine demineralization by a combination of starch and sucrose in a biofilm – caries model. *Braz Oral Res*. 2016;30(1):1–8. doi:10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0052.
5. Hinds LM, Moser EAS, Eckert G, Gregory RL. Effect of Infant Formula on *Streptococcus Mutans* Biofilm Formation. *J Clin Pediatr Dent*. 2016;40(3):178–185. doi:10.17796/1053-4628-40.3.178.
6. Nayak PA, Nayak UA, Khandelwal V. The effect of xylitol on dental caries and oral flora. *Clin Cosmet Investig Dent*. 2014;6:89–94. doi:10.2147/CCIDE.S55761.
7. Decker E-M, Klein C, Schwindt D, von Ohle C. Metabolic activity of *Streptococcus mutans* biofilms and gene expression during exposure to xylitol and sucrose. *Int J Oral Sci*. 2014;6(4):195–204. doi:10.1038/ijos.2014.38.
8. Loo CY, Corliss D a, Ganeshkumar N. *Streptococcus gordonii* Biofilm Formation: Identification of Genes that Code for Biofilm Phenotypes *Streptococcus gordonii* Biofilm Formation: Identification of Genes that Code for Biofilm Phenotypes. 2000;182(5):1374–1382. doi:10.1128/JB.182.5.1374-1382.2000.Updated.
9. Lemos JA, Quivey RG, Koo H, Abranches J. *Streptococcus mutans*: A new Gram-positive paradigm? *Microbiol (United Kingdom)*. 2013;159(PART3):436–445. doi:10.1099/mic.0.066134-0.
10. Olsen I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34(5). doi:10.1007/s10096-015-2323-z.
11. Lynch DJ. An analysis of the role of glucan-binding proteins in *Streptococcus mutans* biofilm



- architecture and caries development by. 2010:161. <http://ir.uiowa.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=2037&context=etd>.
12. Bowen WH, Koo H. Biology of streptococcus mutans-derived glucosyltransferases: Role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res.* 2011;45(1):69–86. doi:10.1159/000324598.
  13. Tahmourespour A, Kermanshahi RK, Salehi R, Pero NG. Biofilm formation potential of oral streptococci in related to some carbohydrate substrates. *African J Microbiol Res.* 2010;4(11):1051–1056.
  14. Diaz, -Garrido N, Lozano C, Giacaman RA. Frequency of sucrose exposure on the cariogenicity of a biofilm-caries model. *Eur J Dent.* 2016;10(3):345–350. doi:10.4103/1305-7456.184163.
  15. Jelen PP. International Dairy Journal } Instructions to Authors.
  16. Cai JN, Jung JE, Dang MH, Kim MA, Yi HK, Jeon JG. Functional relationship between sucrose and a cariogenic biofilm formation. *PLoS One.* 2016;11(6):1–12. doi:10.1371/journal.pone.0157184.
  17. Assaf D, Steinberg D, Shemesh M. Lactose triggers biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Int Dairy J.* 2015;42:51–57. doi:10.1016/j.idairyj.2014.10.008.



INTERNATIONAL SYMPOSIUM  
in CLINICAL DENTISTRY

Dear Colleague,

Thank you for your abstract submission at the **International Symposium in Clinical Dentistry**

Title : Biofilm Formation of Streptococcus Mutan Bacteria After Exposure to Sucrose, Lactose and Xylitol

Authors : Prawati Nuraini, Soetjipto, Indah Listiana Kriswandini, Rini Devijanti Ridwan

We received record number of abstracts and I am delighted to inform you that after consideration and adjudication by the scientific committee your submission has been accepted as a poster presentation.

All of participants expected to submit articles, and will be part of the special issue journal (propose to Scopus indexed). Administration fee for proofread will be charged to participant. Please note that the deadline for full text submission has been extended to the 20 November, 2018. For the author guidelines explained in symposium website: <http://fkg.unair.ac.id/en/international-symposium-in-clinical-dentistry/>

For further queries please contact [symposium@fkg.unair.ac.id](mailto:symposium@fkg.unair.ac.id) or by sending message to Maretaningtias Dwi Ariani, DDS., MS., PhD +62 822-2988-8070

Kind regards,

Scientific Committee  
International Symposium in Clinical Dentistry



