

CALCIUM HYDROXIDE
ENDODONTICS
ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

TESIS

DAYA ANTIMIKROBIAL DAN TOKSISITAS KALSIUM HIDROKSIDA

(PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS)

TK6 01/06

Zub
d



Oleh :

NANIK ZUBAIDAH
NIM.090314997.M

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005

SILIE
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

TESIS

DAYA ANTIMIKROBIAL DAN TOKSISITAS KALSIUM HIDROKSIDA

(PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS)

Oleh :

**NANIK ZUBAIDAH
NIM.090314997.M**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005**

DAYA ANTIMIKROBIAL DAN TOKSISITAS KALSIUM HIDROOKSIDA

(PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS)

T E S I S

**Untuk memperoleh Gelar Magister
Dalam Program Studi Ilmu Kesehatan Gigi
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

Oleh :

**NANIK ZUBAIDAH
NIM.090314997.M**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005**

Lembar persetujuan

**TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 29 AGUSTUS 2005**

Oleh

Pembimbing Ketua

Dr.Trijoedani Widodo,drg,MS,SpKG

NIP.130 368 691

Pembimbing

Dr.Anita Yuliati,drg,M.Kes

NIP. 131 459 658

Mengetahui

Ketua Program Studi Ilmu Kesehatan Gigi



Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Dr.Trijoedani Widodo,drg, MS, SpKG

NIP.130 368 691

Telah diuji pada

Tanggal 14 September 2005

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Dr.Latif Mouduto,drg,MS,SpKG

Anggota : 1. Dr.Trijoedani Widodo,drg,MS,SpKG

2. Dr. Anita Yuliati,drg,M.Kes.

3. Dr.Darmawan Setijanto,drg,M.Kes

4. Markus Budiraharjo,drg,M.Kes

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur saya panjatkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga saya dapat menyelesaikan tesis ini sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan Pendidikan Program Magister Program Studi Ilmu Kesehatan Gigi pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Terimakasih yang sebesar-besarnya serta penghargaan yang setinggi-tingginya saya sampaikan kepada Dr.Trijoedani Widodo, drg, MS, SpKG selaku pembimbing ketua yang telah banyak meluangkan dan menyisihkan waktu di tengah kesibukannya untuk membimbing, mengarahkan , memberi semangat dan dorongan serta membantu dari awal hingga akhir terselesaiannya penulisan tesis ini dengan penuh perhatian dan kesabaran.

Terimakasih yang sebesar-besarnya serta penghargaan yang setinggi-tingginya saya sampaikan kepada Dr.Anita Yuliati, drg, M.Kes selaku pembimbing yang telah banyak meluangkan dan menyisihkan waktu di tengah kesibukannya untuk membimbing, mengarahkan, memberi semangat dan dorongan serta membantu dari awal hingga terselesaiannya penulisan tesis ini dengan penuh perhatian dan kesabaran.

Dalam kesempatan ini, saya ingin menyampaikan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada :

- Rektor Universitas Airlangga Prof. Dr. Med H. Puruhito, SPBT atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan pada saya untuk mengikuti Pendidikan Program Magister Program Studi Ilmu Kesehatan Gigi pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Direktur Pascasarjana Universitas Airlangga Prof. Dr. Muhammad Amin, dr, SpP atas kesempatan memberikan ijin untuk menjadi mahasiswa program magister pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Ketua Program Studi Ilmu Kesehatan Gigi Program Pascasarjana Universitas Airlangga Dr.Trijoedani Widodo, drg, MS, SpKG yang telah memberikan semangat dan dorongan pada awal hingga akhir menempuh pendidikan program magister ini.
- Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Prof. Dr. Mohammad Rubianto, drg, MS, SpPerio, atas ijin dan kesempatan dan fasilitas yang diberikan untuk mengikuti Program Pendidikan Magister pada Program Pascasarjana Unair.
- Ketua laboratorium Ilmu Konservasi Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Achmad Sudirman, drg, MS, SpKG yang telah memberikan ijin dan kesempatan untuk mengikuti Pendidikan Program Magister pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Direktur Rumah Sakit Dr.Sutomo yang telah memberikan ijin dan segala fasilitas untuk bekerja di laboratorium mikrobiologi klinik Rumah Sakit Dr.Sutomo Surabaya
- Ketua laboratorium Mikrobiologi klinik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Eddy Moedihardi, dr, MS, SpMK yang telah memberikan ijin dan tempat untuk

bekerja di laboratorium mikrobiologi klinik mulai awal hingga akhir penelitian untuk tesis ini.

- Prof. Dr. Yoes Prijatna Dachlan, dr, MSc selaku ketua *Tropical Disease Centre* (TDC) yang telah memberikan ijin dan fasilitas untuk melakukan penelitian hingga akhir pendidikan ini.
- Kepala Pusvetma yang telah memberikan ijin untuk menggunakan sarana dan fasilitas laboratorium selama penelitian dan drh Endang Puji serta Bu Erna selaku teknisi laboratorium yang telah banyak membantu saya dalam penelitian ini.
- Dr. Fedik Abdul Rantam, drh yang telah membantu dan mengarahkan dalam mengerjakan penelitian dengan penuh kesabaran dan ketelatenan.
- Dr.Darmawan Setijanto, drg, M.Kes. yang telah membantu menganalisa data statistik penelitian ini.
- Kartuti Debora, dr, MS, SpMK selaku ketua Instalasi laboratorium Mikrobiologi klinik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, yang telah memberikan ijin dan fasilitas untuk bekerja di laboratorium Mikrobiologi klinik Rumah Sakit Dr.Sutomo.
- Markus Budi Rahardjo, drg, M.Kes selaku ketua laboratorium Oral Biologi Fakultas Kedokteran Gigi universitas Airlangga dan sebagai konsultan yang telah membantu memberi masukan dan saran untuk penelitian ini.
- Helen Susilowati, AMD selaku teknisi laboratorium Hepatitis di *Tropical Disease Center* (TDC) dan Prima Nila Destiani, AMD selaku teknisi laboratorium Mikrobiologi klinik Rumah Sakit Dr.Sutomo yang telah ikut membantu demi terlaksananya penelitian ini.

- Teman-teman seangkatan 2002-2003 Agung Krismariono, drg, SpPerio, Masniarti Novita, drg, Enny Willianti, drg yang telah memberikan semangat dan dorongan serta bantuan demi terselesaikannya pendidikan ini.
- Ayah tercinta (alm.) Mayor Purn. H. Achmad Soehadi dan ibu Hj.Muzayahan selaku orang tua kandung serta bapak mertua (alm.) Misdi Pramuadi dan ibu mertua Mukani yang senantiasa tidak henti-hentinya ikut membantu do'a, perhatian serta dukungan dan semangat demi terselesaikannya pendidikan ini.
- Suami tercinta Dr.Kuntaman, dr, MS, SpMK dan anak-anakku yang tercinta Ari, Wiwid dan Tika yang senantiasa mencerahkan kasih yang tulus dan selalu memberikan segala yang terbaik, serta sumber semangat penulis, selalu ikut membantu do'a dan memberi kesempatan, waktu, serta dorongan dan perhatian dengan penuh pengertian selama menyelesaikan pendidikan ini.

Akhirnya kepada semua pihak, yang tidak dapat saya sebut satu per satu yang telah membantu saya baik secara moril maupun materiil demi terselesaikannya tesis ini. Saya ucapkan terimakasih dan mohon maaf apabila terdapat kesalahan baik yang sengaja maupun tidak sengaja. Dan saya mohon saran dan kritikan bila ada kesalahan dalam penulisan tesis ini. Semoga Tuhan Yang Maha Esa membala budi dan amal baik kepada kita semua. Amien Amien Amien.

Surabaya, 30 Agustus 2005.

Penulis

RINGKASAN

Daya antimikrobial dan toksisitas Kalsium hidroksida

Oleh
Nanik Zubaidah

Sejumlah bakteri ternyata masih ada yang tetap hidup di dalam saluran akar meskipun telah dilakukan tindakan preparasi saluran akar dan untuk mendapatkan keadaan saluran akar yang bebas dari bakteri, maka dapat dilakukan pemberian dresing intrakanal (obat saluran akar) setelah tindakan preparasi saluran akar pada perawatan endodontik.

Telah banyak digunakan obat dresing intrakanal, namun akhir-akhir ini diperkenalkan kalsium hidroksida karena mempunyai pH yang alkalis 12,5 dan bersifat antimikrobial yang tinggi. Pasta kalsium hidroksida dapat menimbulkan iritasi pada jaringan periapikal jika keluar dari foramen apikal. Dalam saluran akar ditemukan bakteri *S. viridans* merupakan bakteri yang dominan.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan konsentrasi kalsium hidroksida yang mempunyai daya antimikrobial yang tinggi dan daya sitotoksitas rendah yang akan digunakan sebagai dresing intrakanal.

Telah dilakukan penelitian tentang daya antimikrobal dan toksisitas kalsium hidroksida. Pada penelitian ini sampel di bagi dalam 5 kelompok yang terdiri dari : kelompok I kalsium hidroksida dengan konsentrasi 50%, kelompok II (55%), kelompok III (60%), kelompok IV (65%) dan kelompok V (70%).

Pada Uji antimikrobal kalsium hidroksida dengan berbagai konsentrasi terhadap bakteri *S.viridans* dengan metode difusi agar. Aktivitas antimikrobal ditunjukkan dengan zona hambatan. Pada uji sitotoksitas kalsium hidroksida dengan berbagai konsentrasi terhadap sel fibroblas (BHK-21) menggunakan uji ensimatis yaitu eseji MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl), 2,5-diphenyltetrazolium bromide). Sel hidup diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 595 nm.

Data yang diperoleh dianalisa dengan menggunakan Anova satu arah dilanjutkan uji LSD dengan derajat kemaknaan α 0,05. Hasil analisa dengan Anova satu arah tentang zona hambatan kalsium hidroksida terhadap *S.viridans* diperoleh, ada perbedaan yang bermakna diantara konsentrasi 50%, 55%, 60%, 65% dan 70%. Pada uji LSD dari uji antimikrobal diperoleh konsentrasi 50% dibanding 65%, 70%, konsentrasi 55% dibanding 65% dan 70%, konsentrasi 60% dibanding 65%, 70% dan konsentrasi 65% dibanding 70% ada perbedaan bermakna.

Konsentrasi 50% dibanding 55% dan 60%, konsentrasi 55% dibanding 60% tidak ada perbedaan bermakna. Uji toksisitas kalsium hidroksida terhadap sel fibroblas (BHK-21) diantara konsentrasi 50%, 55%, 60%, 65% dan 70% tidak ada perbedaan yang bermakna.

Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa kalsium hidroksida dengan konsentrasi 60% menunjukkan daya antimikrobal yang paling tinggi dibanding dengan yang lain. Kalsium hidroksida dengan konsentrasi 60% menunjukkan jumlah sel hidup yang paling tinggi dibanding dengan yang lain. Kalsium hidroksida dengan konsentrasi 60% menunjukkan daya antimikrobal yang optimal dan toksisitas rendah.

SUMMARY

The antimicrobial capacity and toxicity of Calcium hydroxyde

By:
Nanik Zubaidah

Some bacteria still survive in the root canal after root canal preparation and intracanal dressing is given in order to have a steril root canal after preparation in endodontic treatment.

The root canal drug using to day as intracanal dressing is calcium hydroxide in paste because it has alkaline pH 12,5 and has a high antimicrobial effect. Calcium hydroxide paste could made irritation in periapical tissues if it runs out from the root canal. In the root canal there is a dominant bacteria *S. viridans*.

The aim of this study is to get the calcium hydroxide concentration that have a highest antimicrobial effect and the lowest cytotoxicity effect that will used as intracanal dressing.

We had study about the antimicrobial effect and toxicity of calcium hydroxide. In this study the sample were divided in 5 groups of the concentration of calcium hydroxide, i.e.: group I = 50% and group II, III, IV, V, were 55%, 60%, 65% and 70% as respectively. Antimicrobial capacity was examined against *Streptococcus viridans*, and the toxicity was tested against fibroblast cell BHK-21.

The antibacterial examination was performed against *Streptococcus viridans* by diffusion method on Mueller Hinton agar. The inhibition zone around Calcium hydroxyde paste was noted as antibacterial capacity. The toxicity test was performed by using fibroblast cell BHK-21. The cell survival was measured by enzymatic method of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl), 2,5-diphenyltetrazolium bromide). The survive cell was detected by spectrophotometer using 595 nm.

The result was analysed by SPSS statistically using Oneway ANOVA and then continued by LSD test (significancy 5%). There was a significantly different of inhibition zone of varied concentration (50%, 55%, 60%, 70%) of Ca(OH)2 against *Streptococcus viridans*. LSD test showed that the significant differences were identified in calcium hydroxide between concentration 50% against 65% and 70%; then 55% against 65% and 70%; then 60% against 65% and 70%; and also between 65% against 70% respectively. There were not significantly difference between 50% against 55% and 60%; and also between 55% against 60%.

There was not significantly difference among varied concentration of calcium hydroxide against Fibroblast cell (BHK-21).

Conclusion: Calcium hydroxide 60% had a highest antimicrobial capacity against *Streptococcus viridans*, but its toxicity was very low, that was shown by the highest number of a cell survive.

ABSTRACT

The antimicrobial capacity and toxicity of Calcium hydroxide

By:

Nanik Zubaidah

Calcium hydroxide had been introduced as an intracanal dressing in the endodontic treatment due to its high alkaline and a high antimicrobial capacity. It also be able to dissolve the necrotic tissue, prevent the dental root resorption and regenerate a new hard tissue. The aims of this study were to identify the concentration of calcium hydroxide that had a highest antimicrobial capacity, the concentration of calcium hydroxide that had lowest toxicity and the concentration of calcium hydroxide that had an optimal antimicrobial effect with the lowest toxicity. It had been sampled 5 groups, 8 samples each of Ca(OH)2 with the concentration as follow: Group I: 50%, Group II: 55%, Group III: 60%, Group IV: 65% and Group V: 70%. The antimicrobial testing was performed using diffusion method against *Streptococcus viridans* and the toxicity test by using enzymatic assay of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol- 2yl)- 2,5 diphenyl tetrazolium bromide, against fibroblast cell (BHK-21). The result of susceptibility test was showed by the inhibition zone diameter and the toxicity detect the survive cell of firoblast that was measured spectrophotometrically using 595 nm beam. We analyze the data using one way anova test with significant difference 0,05 and subsequently LSD test. The result showed that in the concentration 60% calcium hydroxide have the highest antimicrobial effect. In the concentration 50%, 55%, 60%, 65% and 70% calcium hydroxide have low toxicity. Conclusion: Calcium hydroxide 60%, have the highest antimicrobial effect with a low toxicity.

Key words: Calcium hydroxide,, *Streptococcus viridans*, antimicrobial capacity, toxicity, MTT Assay.

DAFTAR ISI

	Hal
Sampul depan.....	ii
Sampul dalam.....	iii
Prasyarat gelar.....	iv
Persetujuan.....	v
Penetapan panitia.....	vi
Ucapan terimakasih.....	x
Ringkasan.....	xiii
Summary.....	xv
Abstract.....	xvi
Daftar isi.....	xx
Daftar tabel.....	xxi
Daftar gambar.....	xxii
Daftar lampiran.....	1
BAB. 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar belakang masalah	1
1.2 Rumusan masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian.....	6
1.3.1 Tujuan Umum	6
1.3.2 Tujuan Khusus	6
1.4 Manfaat Penelitian	7
 BAB. 2 TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1. Perawatan Endodontik	8
2.2. Dresing Intrakanal.....	9
2.2.1. Kalsium hidroksida.....	10
2.2.2. Sifat kalsium hidroksida.....	11

2.3. Mekanisme antimikrobal terhadap bakteri	12
a. Merusak membrane sitoplasma.....	13
b. Denaturasi protein.....	14
c. Merusak DNA.....	14
2.4. Bakteri saluran akar	14
2.4.1 Bakteri <i>Streptococcus</i>	15
2.4.2 Morfologi dan identifikasi.....	16
a. Ciri organisme.....	16
b. Kultur.....	16
c. Karakteristik.....	17
2.4.3. Bakteri <i>Streptococcus viridans</i>	17
a. <i>Streptococcus</i> α hemolitikus.....	18
b. <i>Streptococcus</i> β hemolitikus.....	18
c. <i>Streptococcus</i> γ hemolitikus.....	18
2.5 Uji antimikrobal.....	18
2.6 Sitotoksitas	19
2.7 Kultur sel	20
a.kultur primer.....	20
b.Kultur sel diploid.....	20
c. Kultur sel kontinyu.....	20
2.8 Sel fibroblas.....	21
2.9 Esei MTT.....	22
 BAB. 3 KERANGKA KONSEPTUAL	23
3.1 Kerangka konseptual Penelitian.....	23

BAB.4 METODE DAN MATERI PENELITIAN.....	26
4.1. Jenis Penelitian.....	26
4.2. Rancangan Penelitian	26
4.3. Unit Penelitian	26
4.3.1 Sampel penelitian.....	26
4.3.2. Variabel Penelitian	26
4.4 Kelompok sample.....	27
4.5 Definisi Operasional	27
4.6. Bahan Penelitian	28
4.7 Alat Penelitian	29
4.8. Lokasi Penelitian.....	30
4.9. Prosedur Penelitian.....	30
4.9.1 Uji Antimikrobal.....	30
a. Pembuatan pasta kalsium hidroksida.....	30
b. isolasi bakteri <i>S. viridans</i>	31
c. Identifikasi bakteri <i>S. viridans</i> dengan pengecatan gram.....	32
d. Cara kerja uji antimikrobal.....	32
4.9.2 Uji Stotoksisitas.....	34
a. Tahap pembuatan ekstrak kalsium hidroksida.....	34
b. Cara kerja uji sitotoksisitas.....	34
4.10 Analisa statistik.....	37
4.12 Alur penelitian.....	38
BAB. 5 ANALISA HASIL PENELITIAN	39
5.1 Data uji antimikrobal.....	39
5.2 Data uji sitotoksisitas.....	42

BAB. 6 PEMBAHASAN.....	46
6.1 Uji Antimikrobal.....	46
6.2 Uji Sitotoksitas.....	50
BAB.7 KESIMPULAN DAN SARAN.....	55
7.1 Kesimpulan	55
7.2 Saran	55
DAFTAR PUSTAKA.....	56

DAFTAR TABEL

	Hal
Tabel 5.1. Hasil rerata dan standart deviasi diameter zona hambatan kalsium hidroksida dengan berbagai konsentrasi terhadap bakteri <i>S.viridans</i> (mm)	39
Tabel 5.2. Hasil uji one way ANOVA diameter zona hambatan antar kelompok	41
Tabel 5.3. Hasil uji LSD diameter zona hambatan kalsium hidroksida dengan berbagai konsentrasi terhadap bakteri <i>S.viridans</i>	42
Tabel 5.4. Hasil rerata dan standart deviasi uji sitotoksitas pada kalsium hidroksida dengan berbagai konsentrasi terhadap sel fibroblas BHK-21 (OD)	43
Tabel 5.5. Hasil uji ANOVA satu arah uji sitotoksitas pada kalsium hidroksida dengan berbagai konsentrasi terhadap sel fibroblas BHK-21.	45

DAFTAR GAMBAR

	Hal.
Gambar 4.1. Bahan yang digunakan untuk uji Sitotoksitas .	29
Gambar 4.2. Zona hambatan pada Media Muller Hilton Agar.	33
Gambar 4.3. Sel fibroblas(BHK-21) di dalam botol roux..	34
Gambar 4.4. Uji Sitotoksitas yang dilakukan pada mikroplate	35
Gambar 4.5. Perangkat <i>ELISA reader</i> yang menggunakan dasar Spektrofotometer.	36
 Gambar 4.6. Grafik rerata zona hambatan kalsium hidroksida dengan berbagai konsentrasi terhadap <i>S.viridans</i> .	 40
 Gambar 4.7. Grafik rerata uji sitotoksitas kalsium hidroksida terhadap sel fibroblas (BHK-21).	 44

DAFTAR LAMPIRAN

	Hal
Lampiran 1. Data hasil pengukuran diameter zona hambatan kalsium hidroksida terhadap bakteri <i>Streptococcus viridans</i> dengan uji Antimikrobial (mm).	61
Lampiran 2. Data hasil pengukuran jumlah sel hidup dengan <i>Spectrophotometer</i> pada uji Sitotoksitas kalsium hidroksida terhadap sel fibroblas (BHK-21) (OD).	62
Lampiran 3. Hasil analisa statistik ANOVA satu arah pada uji Antimikrobial kalsium hidroksida terhadap bakteri <i>Streptococcus viridans</i> .	63
Lampiran 4. Hasil uji LSD zona hambatan kalsium hidroksida dengan berbagai konsentrasi terhadap <i>Streptococcus viridans</i> .	64
Lampiran 5. Uji Distribusi normal – uji Antimikrobial 50%, 55%, 60%.	65
Lampiran 6. Uji Distribusi Normal – uji Antimikrobial 65%, 70%.	66
Lampiran 7. Hasil analisa statisktik ANOVA satu arah pada uji sitotoksitas kalsium hidroksida dengan berbagai konsentrasi terhadap sel fibroblas (BHK-21).	67
Lampiran 8. Hasil penelitian pendahuluan diameter zona hambatan	68
Lampiran 9. Hasil penelitian pendahuluan pengukuran pH	69
Lampiran 10. Pernyataan persetujuan	70

BAB. 1**PENDAHULUAN****1.1 Latar Belakang Masalah**

Bahan kalsium hidroksida [Ca (OH)₂] telah banyak digunakan di bidang Kedokteran gigi terutama pada perawatan endodontik diantaranya sebagai *lining cavitas*, *pulp capping*, perawatan perforasi iatrogenik pada dasar kavitas dan dinding saluran akar, bahan pengisi saluran akar (*filler*), pasta saluran akar (*sealer*), dan bahan irigasi saluran akar (Tziafas & Economides, 1999; Hosoya,*et al* 2001; Solak & Oztan, 2003, Estrela, 2003). Akhir-akhir ini kalsium hidroksida banyak diperkenalkan sebagai dresing intrakanal (obat saluran akar) untuk mendapatkan keadaan saluran akar yang steril. Oleh karena kalsium hidroksida mempunyai sifat antimikrobial, mampu melarutkan jaringan nekrotik, menghambat resorpsi akar gigi, mengadakan perbaikan dengan membentuk jaringan keras (Leonardo & Sielveira, 2002; Estrela, 2003).

Perawatan endodontik meliputi preparasi saluran akar, sterilisasi dan pengisian saluran akar yang disebut dengan *triad endodontic*. Paradigma baru perawatan endodontik terdiri dari 3 tahap yaitu preparasi yang meliputi pembersihan (*cleaning*) yang bertujuan untuk membersihkan jaringan nekrotik dan bakteri yang ada di dalam saluran akar, pembentukan (*shaping*) bertujuan untuk membentuk saluran akar dan pengisian saluran akar (*filling*). Saluran akar perlu diisi untuk mencegah bakteri dan cairan jaringan masuk ke dalam sistem saluran yang dapat menyebabkan terjadi reinfeksi (Akbar, 2000). Ketiganya tetap saling berkaitan agar mendapatkan hasil

perawatan yang baik (Stock & Nehammer,1990; Grossman *et al*, 1995; Widodo, 2000).

Preparasi dan irigasi saluran akar, meskipun sudah dilakukan dengan benar belum dapat dihasilkan saluran yang sama sekali bebas bakteri, oleh karena diperlukan pemberian dresing intrakanal di antara kunjungan, terutama pada perawatan endodontik beberapa kali kunjungan (*multi visit*) (Barbosa & Goncalves,1997; Solak & Oztan,2003).

Beberapa syarat yang harus dipenuhi sebagai dresing intrakanal antara lain bersifat antimikrobial dan tidak mengiritasi jaringan periapikal. Dresing intrakanal yang selama ini sering digunakan adalah golongan fenol yang meliputi *formocresol*, *cresophen*, *camphorated parachlorophenol (CHKM)*, *eugenol*, *metakresilasetat*, dan *creosote*. Obat golongan ini bersifat toksik dan efektif hanya dalam waktu singkat. (Estrela, 2003).

Sediaan kalsium hidroksida murni umumnya berbentuk bubuk, dan penggunaan secara klinis dalam bentuk pasta. Pasta dibuat dengan mencampur bubuk kalsium hidroksida dengan suatu pelarut (*vehicle*) seperti akuabides steril, salin, larutan anestesi lokal (*citanest-oktapressin 3%*), *camphorated monochlorophenol (CHKM)*, *cresatin*, *glyserin*, *methylcellulose*, *propylene glycol*, *chlorhexidine*,dll (Solak & Oztan, 2003).

Penggunaan umum kalsium hidroksida secara klinis pada konsentrasi 50 % (50 gram bubuk kalsium hidroksida / 100 ml akuabides steril) atau sesuai aturan pabrik (Siqueira & Uzeda, 1998). Hosoya *et al* (2001) & Estrela (1998) menggunakan kalsium hidroksida dengan konsentrasi 44% dan 38% dengan pH 11,24 dalam

penelitiannya untuk melihat pelepasan ion kalsium dan ion hidroksil di sekitar daerah apikal dari saluran akar gigi selama 3 hari.

Sjogren et al (1991) mengatakan pasta kalsium hidroksida tetap efektif selama berada di dalam saluran akar dan menunjukkan daya antimikrobal selama 7 hari. Dilaporkan bahwa kalsium hidroksida merupakan desinfektan yang kuat dalam saluran akar (Grossman et al,1995). Kalsium hidroksida merupakan dresing intrakanal yang sangat menguntungkan dibanding dengan golongan *fenol* atau *formaldehyde* karena kalsium hidroksida juga mempunyai efek sedatif (mengurangi rasa sakit), mencegah exudasi dan mempunyai pH tinggi sekitar 12,5 sehingga bersifat antimikrobal yang efektif terhadap bakteri (Grossman et al,1995; Suzuki et al,1999; Hosoya et al,2001).

Bakteri yang banyak ditemukan di dalam saluran akar yang terinfeksi adalah jenis bakteri gram positif diantaranya *Streptococcus* yaitu *Streptococcus viridans* yang termasuk golongan *Streptococcus α hemolyticus*, *Lactobacillus* dan *Staphylococcus*, disusul oleh bakteri golongan gram negatif dan sedikit golongan jamur (Pitt Ford,1997; Siqueira & Lopes,1999). Grossman et al (1995) menemukan dominasi *Streptococcus α hemolyticus* seperti *Streptococcus viridans* (63 %), *Staphylococcus albus* (17 %), *Diphtheroid bacilli* (6,5 %), *Staphylococcus aureus*, *Bacillus proteus*, *Bacillus coli*. Syaifuddin (1986) menemukan *Streptococcus α hemolyticus* (76,6 %) dan bakteri *obligate anaerobe* sebanyak 23,4 %.

Selain mempunyai sifat antimikrobal, kalsium hidroksida yang digunakan sebagai dresing intrakanal juga harus bersifat antitoksik. Chang Chao (1998)

mengatakan bahwa aspek biologi dan toksikologi dari suatu bahan adalah penting sekali di dalam penggunaan secara klinis. Stock & Nehammer (1990) mengatakan bahwa dengan menggunakan dresing intrakanal mempunyai khasiat antimikrobial yang kuat, tidak hanya membunuh bakteri, tetapi juga dapat menimbulkan iritasi pada jaringan perirapikal dan jaringan hidup yang sehat serta dapat menghambat kesembuhan.

Dresing intrakanal maupun sealer, jika keluar dari saluran akar akan menimbulkan iritasi jaringan periapikal (Vajrabhaya *et al*, 1997). Pendapat ini didukung oleh Wayman *et al* (1992) yang menemukan 17 dari 58 kasus yang perlu tindakan pembedahan periapikal karena kegagalan endodontik yang disebabkan oleh keluarnya sealer ke periapikal.

Macachi *et al* (1998) menganjurkan penggunaan kalsium hidroksida sebagai dresing intrakanal karena mempunyai toksisitasnya yang rendah dan mempunyai aktifitas bakterisidal, sedangkan Schwartz (2001) mengatakan bahwa kalsium hidroksida bahaya jika keluar dari periapikal dan masuk ke dalam *canalis alveolaris inferior* akan menimbulkan neurotoksik.

Beberapa bahan endodontik yang mengandung kalsium hidroksida dengan berbagai merk dagang misalnya *diaket* menimbulkan efek toksik meskipun hanya dalam jumlah kecil. *Sealapex* menimbulkan sitotoksik yang sangat tinggi dibanding apexit (*sealapex, apexit dan diaket* merupakan *sealer* yang berbahan dasar kalsium hidroksida). Sebagian besar bahan endodontik yang berbahan dasar kalsium hidroksida baik yang digunakan sebagai *sealer* maupun dresing intrakanal apabila

kontak langsung dengan saluran akar dapat merusak jaringan sekitarnya (Geurtsen & Leyhausen, 1997; Walton & Torabinej, 1998).

Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan dari kalsium hidroksida yang dicampur dengan akuabides steril dengan berbagai konsentrasi mulai dari 25% hingga 100% dengan perbedaan interval 5%. Dilakukan pengukuran pH pada setiap konsentrasi tersebut, ternyata didapatkan kalsium hidroksida dengan konsentrasi 25 % sampai dengan 100% rerata pH adalah 12,71 (lihat lampiran hal.68).

Saat ini banyak dijual di pasaran sediaan bahan endodontik yang berbahan dasar kalsium hidroksida yang digunakan untuk dresing intrakanal dalam bentuk kemasan berupa pasta dengan berbagai merk dagang dengan harga cukup mahal. Pada penelitian ini akan digunakan kalsium hidroksida murni, karena harga relative murah. Diharapkan bahan kalsium hidroksida murni ini dalam perawatan endodontik akan dapat di aplikasikan sebagai dresing intrakanal.

Pada penelitian ini akan dilakukan uji antimikrobial dan uji sitotoksitas dari kalsium hidroksida. Daya antimikrobial terhadap *S. viridans* dari bahan kalsium hidroksida di uji pada difusi agar dengan melihat zona hambatan. Daya toksitas dari kalsium hidroksida dilakukan pada kultur sel dengan metode MTT [3-(4,5 dimethyl thiazol 2yl), 2,5 diphenyltetrazolium bromide]. Sel yang digunakan adalah jenis fibroblas yang berasal dari Baby Hamster Kidney (BHK-21), dan sel hidup diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 595 nm. Pada penelitian ini akan ditentukan konsentrasi kalsium hidroksida dengan daya antimikrobial yang optimal dengan toksitas yang rendah setelah bubuk kalsium hidroksida dicampur dengan akuabides steril.

1.2. RUMUSAN MASALAH

Berkaitan dengan hal di atas, maka timbul permasalahan sebagai berikut ;

1. Pada konsentrasi berapa kalsium hidroksida mempunyai daya antimikrobial yang maksimal?
2. Pada konsentrasi berapa kalsium hidroksida mempunyai daya sitotoksitas yang rendah?
3. Pada konsentrasi berapa kalsium hidroksida mempunyai daya antimikrobial optimal dengan daya toksitas rendah?

1.3. TUJUAN PENELITIAN

1.3.1. Tujuan Umum

Untuk mendapatkan konsentrasi kalsium hidroksida yang dapat digunakan sebagai dresing intrakanal dalam perawatan endodontik.

1.3.2. Tujuan Khusus

- a. Untuk menentukan konsentrasi dari kalsium hidroksida yang mempunyai daya antimikrobial yang maksimal.
- b. Untuk menentukan konsentrasi dari kalsium hidroksida yang mempunyai daya sitotoksitas rendah. Untuk menentukan konsentrasi kalsium hidroksida yang mempunyai daya antimikrobial yang optimal dengan daya toksitas rendah.

1.4. MANFAAT PENELITIAN

Dengan didapatkan konsentrasi kalsium hidroksida yang tepat, untuk digunakan sebagai dressing intrakanal maka didapatkan hasil perawatan endodontik yang baik.

BAB. 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. PERAWATAN ENDODONTIK

Perawatan endodontik merupakan bagian dari perawatan konservasi gigi yaitu perawatan saluran akar gigi, yang bertujuan untuk mempertahankan gigi selama mungkin di dalam rongga mulut. Perawatan endodontik adalah perawatan saluran akar dengan cara mengeluarkan jaringan pulpa, jaringan nekrotik, debris, bakteri, dan membentuk dinding saluran akar, yang kemudian diikuti dengan pengisian saluran akar dengan bahan pengisi saluran akar (Grossman *et al*, 1995). Tahap perawatan endodontik terdiri dari preparasi, sterilisasi dan pengisian saluran akar yang disebut dengan *triad endodontic*. Tahap tersebut saling terkait satu dengan lainnya sehingga dapat tercapai perawatan endodontik yang maksimal (Widodo, 2000).

Stock & Nehammer (1990) menyatakan bahwa tiga prinsip perawatan endodontik modern adalah *cleaning* : membersihkan bakteri dan debris dari saluran akar, *shaping* : membentuk saluran akar dan *filling* : pengisian saluran akar. Meskipun sudah dilakukan preparasi dan irigasi saluran akar, belum dapat dipastikan bahwa saluran akar sama sekali bebas bakteri terutama pada perawatan endodontik *multy visit*. Untuk mencapai sterilitas yang optimal perlu dilakukan pemberian dresing intrakanal di antara kunjungan (Solak & Oztan, 2003).

2.2 DRESING INTRAKANAL (OBAT SALURAN AKAR)

Dresing intrakanal merupakan suatu bahan desinfeksi saluran akar yang dapat membunuh bakteri patogen di dalam saluran akar (Grossman *et al*, 1995). Bahan ini digunakan untuk sterilisasi saluran akar setelah tahap preparasi saluran akar pada perawatan endodontik (Walton & Torabinej, 1998).

Tujuan penggunaan dresing intrakanal antara lain: memberikan aktifitas antimikrobial di ruang pulpa dan periapikal, menetralisir sisa preparasi di saluran akar agar tidak aktif, mengontrol atau mencegah nyeri setelah perawatan, mengeliminasi bakteri yang hidup di dalam saluran akar, mencegah proliferasi bakteri di dalam saluran akar di antara kunjungan, mencegah reinfeksi saluran akar, mencegah pemberian makanan pada bakteri yang tertinggal setelah preparasi biomekanik saluran akar. Bahan dresing intrakanal dapat mencapai daerah di dalam saluran akar yang sulit dibersihkan (saluran akar tambahan) dan tubuli dentin (Siqueira & Uzeda, 1998; Suzuki *et al*, 1999).

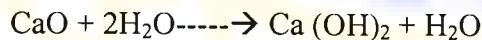
Pada awal tahun 1900 ditemukan teori tentang fokus infeksi dengan penggunaan dresing intrakanal yang mempunyai antimikrobial yang kuat untuk perawatan saluran akar, sehingga menghasilkan saluran akar dan jaringan periapikal menjadi steril dan mencegah kemungkinan penyebaran bakteri yang berbahaya ke seluruh tubuh (Estrela,2003). Grossman *et al* (1995) dan Suzuki *et al* (1999) mengatakan bahwa, dresing intrakanal dapat merusak bakteri patogenik serta membunuh flora mikrobial di dalam saluran akar yang terinfeksi.

Syarat obat yang digunakan sebagai dresing intrakanal menurut Grossman *et al* (1995) antara lain : suatu germisida dan fungisida yang efektif, tidak mengiritasi jaringan periapikal, tetap stabil dalam larutan, mempunyai daya antimikrobial yang lama, aktif dengan adanya darah dan serum dan derivat protein jaringan, mempunyai tegangan permukaan rendah, tidak mengganggu penyembuhan jaringan periapikal, tidak mengubah warna gigi.

Beberapa macam obat yang berfungsi sebagai dresing intrakanal yang sering digunakan di bidang Kedokteran gigi antara lain golongan fenol yang meliputi *formokresol, CHKM, eugenol, metacresilasetat, cresatin*, dll. Obat tersebut (terutama golongan *fenol*) mempunyai sifat toksik yang hanya efektif dalam waktu singkat. Kalsium hidroksida sebagai dresing intrakanal dianggap sangat efektif dan mempunyai sifat antimikrobial serta dapat diletakkan di dalam saluran akar dalam waktu yang lama diantara kunjungan. Secara *in vitro*, kalsium hidroksida mampu melarutkan jaringan nekrotik pulpa (Leonardo & Sielveira, 2002; Estrella, 2003).

2.2.1 KALSIUM HIDROKSIDA

Sejak tahun 1920 Herman telah menggunakan kalsium hidroksida untuk terapi endodontik pada gigi non vital. Bentuk kalsium hidroksida dapat berupa bubuk atau pasta. Pasta dibuat dengan mencampur bubuk kalsium hidroksida dengan akuabides steril melalui reaksi kimia dan physik sebagai berikut :



Menurut Estrela (2003) kalsium hidroksida merupakan bubuk halus dengan berat molekul 74,10 gram dan diameter bubuk 0,042 μ . Komposisi kalsium hidroksida terdiri dari : Kalsium = 54,04 %; Oksigen = 43,19 %, Hidrogen = 2,72 %.

Kalsium hidroksida mempunyai sifat alkali dengan pH sekitar 12,5, mempunyai aktifitas antimikrobal yang tinggi terhadap bakteri rongga mulut. Kalsium hidroksida dalam bentuk cair diuraikan ke dalam ion calcium (Ca^2) dan ion hidroksil (OH^-) yang dapat menghambat enzim membran sitoplasmik pada jaringan melalui aktivasi *alkaline phosphatase* akan memberikan sifat antimikrobal dan mineralisasi (Grossman *et al*,1995; Walton & Torabinej, 1998; Estrella & Uzeda, 1998). Kalsium hidroksida dapat dicampur dengan air, gliserin, *methylcellulosa*, larutan saline, larutan anestesi lokal dan lain-lain menjadi bentuk pasta.

Pasta kalsium hidroksida digunakan sebagai suatu dresing intrakanal pada perawatan endodontik jika ada penundaan waktu yang lama diantara kunjungan karena bahan ini tetap efektif selama berada di dalam saluran akar (Grossman *et al*, 1995; Estrela, 2003 dan Solak & Oztan, 2003).

2.2.2 SIFAT KALSIUM HIDROKSIDA

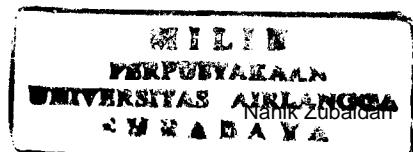
Kalsium hidroksida merupakan obat saluran akar yang selain digunakan sebagai bahan pengisi saluran akar (*filler*), pasta saluran akar (*sealer*), bahan irigasi saluran akar juga dapat sebagai dresing intrakanal. Menurut Cohen & Burn (1994); Solak & Oztan (2003) mengatakan bahwa kalsium hidroksida dipilih sebagai dresing intrakanal karena mempunyai sifat sebagai berikut : mampu menginduksi

pembentukan jaringan keras, bertindak sebagai antimikrobial, mampu melarutkan jaringan nekrotik pulpa, merangsang aktifitas odontoblas, mampu menembus saluran akar tambahan (*accessories root canal*) dan tubuli dentin sehingga menurunkan permeabilitas permukaan dentin, dapat menetralisir lingkungan asam yang dihasilkan oleh aktifitas osteoklast sehingga dapat mencegah kerusakan lebih lanjut dari jaringan yang termineralisasi, membantu pengeringan eksudat yang berlebih, karena adanya ion kalsium sehingga dapat mengurangi permeabilitas pembuluh darah kapiler.

Pemberian pasta kalsium hidroksida sebagai dressing intrakanal ke dalam saluran akar akan meningkatkan pH, menghasilkan suatu lingkungan yang alkalis di sekitar jaringan dengan mengadakan difusi ion hidroksil melalui tubuli dentin. Peningkatan pH membuat kalsium hidroksida bersifat bakterisidal dan menghambat aktifitas osteoklast dengan baik jika dilarutkan dalam akuabides steril. Kalsium hidroksida mempunyai kelarutan dalam air rendah (0,16 gram dalam 100 ml air pada 30° C) terurai menjadi ion hidroksil (OH^-) dan ion kalsium (Ca^{2+}), adanya ion hidroksil di dalam larutan membuat lingkungan menjadi alkalis ($\text{pH} = 12,5$ pada 37° C) dan bersifat antimikrobal (Tronstat *et al*, 1981; Safavi & Nakayama, 2000; Solak & Oztan, 2003).

2.3 MEKANISME KERJA ANTIMIKROBIAL KALSIUM HIDROKSIDA TERHADAP BAKTERI

Pada umumnya mekanisme antimikrobal dapat dibagi dalam 5 kelompok utama yaitu menghambat metabolisme sel bakteri, menghambat sintesa dinding sel bakteri, menghambat sintesa protein sel bakteri, menghambat sintesa atau merusak asam



nukleat sel bakteri dan mengganggu permeabilitas membran sel bakteri dan menurunkan tegangan permukaan yang menyebabkan permeabilitas sel membran meningkat, sehingga air masuk dan berakibat sel bakteri pecah dan sel bakteri mengalami kematian (Ganiswarna, 1997; Brooks *et al*,2001).

Dresing intrakanal menunjukkan daya antimikrobial yang tinggi dan daya toksitas rendah. Hal ini secara tidak langsung menjelaskan bahwa obat berbahaya bagi parasit namun tidak membahayakan bagi tubuh. Konsentrasi obat harus toleran terhadap tubuh, dan merusak bakteri penyebab infeksi (Brooks *et al*,2001). Bakteri yang ditemukan di dalam saluran akar dapat dieliminasi dengan pemberian dresing intrakanal kalsium hidroksida yang mempunyai daya antimikrobial dengan pH tinggi. Aktifitas antimikrobial ini dihubungkan dengan pelepasan ion hidroksil yang merusak membran bakteri menyebabkan kematian bakteri.

Menurut Siqueira & Lopes (1999) mengatakan bahwa efek kematian pada sel bakteri akibat penggunaan dresing intrakanal kalsium hidroksida kemungkinan antara lain:

a. Merusak sel membran sitoplasma bakteri.

Membran sitoplasma bakteri mempunyai fungsi penting untuk kehidupan sel seperti permeabilitas selektif dan transpot larutan, elektron dan phosphorilasi oksidasi, menghasilkan ensim dan membawa molekul yang berfungsi di dalam biosintesis DNA, dinding sel polimer dan membran lipid. Ion hidroksil menyebabkan peroksidasi lipid, menghasilkan kerusakan lipid dan komponen struktur dari membran sel.

b. Denaturasi protein.

Metabolisme seluler sangat tergantung pada aktifitas ensimatisik . Ensim mempunyai stabilitas dan aktifitas yang optimum dan pH netral. Alkalinasi yang disebabkan oleh kalsium hidroksida menyebabkan pecahnya ikatan ion yang mempertahankan struktur tersier dari protein, akibatnya ensim mempertahankan struktur kovalen tetapi rantai polipeptida berubah tidak teratur. Perubahan ini sering menghasilkan hilangnya aktifitas biologis dari ensim dan perpecahan dari metabolisme seluler, sehingga struktur protein dirusak oleh ion hidroksil.

c. Merusak DNA

Reaksi ion hidroksil dengan DNA bakteri menyebabkan rantai DNA, gene hilang, akibatnya hambatan replikasi dan aktifitas selular tidak tersusun dan ion radikal bebas dapat menyebabkan *lethal mutation*.

Bahan antimikroba merupakan suatu bahan kimia yang mempunyai sifat bakterisidik yaitu membunuh bakteri dengan cara mematikan atau bakteriostatik yakni menghambat pertumbuhan bakteri tetapi tidak membunuhnya (Katzung, 2001).

2.4 BAKTERI SALURAN AKAR

Bakteri dan produknya sangat berperan penting di dalam patogenesa dari penyakit pulpa dan perapikal. Semua bakteri yang ada di dalam rongga mulut dapat masuk ke dalam saluran akar mengakibatkan infeksi endodontik (Estrela & Uzeda, 1998; Lambrianidis *et al*, 1999). Bakteri rongga mulut yang umum dan paling sering

ditemukan di dalam saluran akar adalah jenis *Streptococcus* dan *Lactobacillus*. Bakteri yang paling sering diisolasi dari dalam saluran akar yang terinfeksi adalah *Streptococcus viridans* yang termasuk golongan *Streptococcus α hemolyticus* dan merupakan kelompok yang terbanyak dari flora rongga mulut sekitar 30 – 60 % (Pitt Fort, 1997). Grossman et al (1995) telah menemukan dominasi *Streptococcus viridans* sebanyak 63%, 20% *Staphylococcus* dan sisanya bakteri *corynebacteria* dan jamur yang ada di dalam saluran akar yang terinfeksi (Grossman et al, 1995; Sommer et al, 1996).

2.4.1 BAKTERI STREPTOCOCCUS

Streptococcus merupakan bakteri gram positif berbentuk bulat, yang mempunyai karakteristik dapat membentuk pasangan atau rantai selama pertumbuhannya. Bakteri ini tersebar di alam. Beberapa diantaranya merupakan anggota flora normal pada manusia, sedang *Streptococcus* yang lain berhubungan dengan penyakit pada manusia dapat berupa infeksi oleh *Streptococcus* dan sebagian yang lain dapat menimbulkan sensitisasi akibat bakteri tersebut. *Streptococcus* memiliki berbagai macam kandungan bahan ekstrasellular dan enzim (Brooks et al, 2001).

Streptococcus termasuk kelompok bakteri yang heterogen, dan tidak ada satu sistem pun yang mampu untuk mengklasifikasikannya. Terdapat dua puluh jenis, termasuk *Streptococcus pyogenes* (group A), *Streptococcus actiaeagale* (group B) dan jenis *Enterococcus* (group D), dapat dicirikan dengan berbagai tampilannya yang

bervariasi dari karakteristiknya, koloni pertumbuhan, pola hemolisa pada media agar darah (hemolisa α , hemolisa β , atau tanpa hemolisa), komposisi antigen pada substansi dinding sel dan rekasi biokimia. Sebagian *Streptococcus* patogen tumbuh dengan baik pada suhu 37° C, sedang bakteri *Enterococcus* kelompok D dapat tumbuh baik dalam suhu 15° C sampai 45 °C (Jaklik,1984; Brooks,2001).

2.4.2 MORFOLOGI DAN IDENTIFIKASI *S.VIRIDANS*

Untuk mengenal ciri-ciri bakteri *S.viridans* perlu dibahas beberapa hal antara lain (Brooks,2001) :

a. Ciri organisme : berbentuk *coccus* tunggal mempunyai bentuk seperti bola atau bulat dan tersusun seperti rantai. *Coccus* ini membelah diri dengan arah memanjang pada sumbu dari rangkaian tersebut. Bagian dari rangkaian tampak *diplococcus* dan kadang terlihat seperti batang. Panjang dari rangkaian ini sangat beragam dan disebabkan oleh faktor lingkungan. *Streptococcus* adalah bakteri gram positif, pada umur biakan tertentu dan bila bakteri mati maka akan kehilangan sifat gram positifnya dan kemudian berubah menjadi gram negatif. Hal ini dapat terjadi setelah dilakukan inkubasi selama semalam. Beberapa *streptococcus* memiliki kapsul berupa polisakarida. Kapsul ini mudah diamati pada saat perbenihan awal. Dinding sel pada streptococcus terdiri dari protein, karbohidrat dan peptidoglikan.

b. Kultur: *Streptococcus* dapat tumbuh dalam media yang padat dan tampak sebagai koloni *discoid*, berdiameter 1 – 2 mm. Strain yang menghasilkan bahan berupa kapsul seringkali berkembang ke arah koloni mucoid.

c. Karakteristik pertumbuhan : pertumbuhan *Streptococcus* cenderung lambat pada media padat atau pada media cair kecuali jika diperkaya dengan cairan darah atau cairan jaringan. Pertumbuhan dan proses hemolisis akan dibantu dengan mengeramkan bakteri dalam suasana CO₂ 10%. Sebagian besar bakteri *Streptococcus* bersifat fakultatif anaerob.

2.4.3 BAKTERI *STREPTOCOCCUS VIRIDANS*

Bakteri *S.viridans* tumbuh baik dalam media lempeng agar darah (*Blood Agar*) dan 10% darah yang dieramkan selama 48 jam pada suhu 37° C. *Streptococcus viridans* akan mati dengan pemanasan basah suhu 60° C selama 1,5 jam, sedang dengan pemanasan kering (*dry heat oven*) suhu 160° C selama 1jam. Bentuk koloni *Streptococcus viridans* adalah kecil, halus, jernih, cembung, mukoid dengan diameter 0,5 – 1 mm. Pada pengecatan gram tampak adanya sel berderet, bentuk bulat dan lonjong, non motil, tidak berspora, dan gram positif serta berderet menyerupai rantai pendek dengan 8 – 10 sel dan ukuran sel 1 – 2 µm. *Streptococcus* bersifat fakultatif anaerob pada media agar darah, sedang koloninya berwarna hijau karena mengadakan hemolisa sebagian (Watts, 1990 & Aravena, 1993).

Bakteri *Streptococcus viridans* antara lain adalah *S.mitis*, *S.mutans*, *S.salivarius*, *S.sanguis* dan lain-lain. Secara tipikal, bersifat hemolitik α, tetapi kemungkinan lain bersifat non hemolitik. Pertumbuhannya tidak dihambat oleh optochin dan koloninya tidak dapat larut *dalam empedu (deoxycholate)*. Beberapa bakteri *Streptococcus viridans* (misal *S.mutans*) mensintesa banyak polisakarida seperti dekstran atau

sukrosa dan mempunyai peranan penting pada proses pembentukan karies gigi (Brooks *et all*, 2001)

Berdasarkan sifat hemolisa pada media lempeng agar darah maka *Streptococcus* dibagi kedalam :

- a. *Streptococcus α hemolyticus* : menghasilkan hemolisa sebagian dengan warna hijau sekitar koloni pada media agar darah. Oleh karena itu disebut *Streptococcus viridans* (*viridans* = hijau), yang termasuk golongan ini adalah: *Streptococcus mutan*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* dan *Streptococcus milleri*.
- b. *Streptococcus β hemolyticus* : menghasilkan hemolisa sempurna dengan warna jernih sekitar koloni, yang termasuk golongan ini adalah *Streptococcus pyogenes*.
- c. *Streptococcus γ hemolyticus* : tidak menghasilkan hemolisa pada media agar darah, yang termasuk golongan ini adalah *Streptococcus faecalis* (Jaklik, 1984; Aravena, 1993).

2.5 UJI ANTIMIKROBIAL.

Uji antimikrobial adalah uji kepekaan bakteri terhadap obat atau bahan. Uji ini dapat dilakukan dengan berberapa metode antara lain metode dilusi yang terdiri dari dua macam yakni dilusi *broth* dan dilusi agar, sedang metode yang lain adalah difusi agar. Pada metode dilusi digunakan pengenceran seri yaitu kontak langsung di dalam larutan antara sel bakteri dengan bahan yang diuji (Siqueira,1998). Kegunaan metode ini untuk mencari kadar hambat minimal (KHM) atau *Minimal Inhibition Concentration (MIC)* dari suatu bahan atau obat terhadap bakteri. Prinsip penggunaan

metode difusi agar adalah untuk melihat zona hambatan dari bakteri terhadap suatu bahan atau obat di uji. Metode ini umumnya digunakan untuk evaluasi aktivitas antimikrobal dari bahan endodontik (Morrier,2003).

Gomes *et al* (2002) mengatakan bahwa hasil uji antimikrobal dengan menggunakan metode difusi agar akan tergantung beberapa hal antara lain : ukuran molekul bahan, solubilitas dan difusibilitas dari bahan melalui medium agar, sensitivitas obat, sumber bakteri (strain atau kumpulan spesies), jumlah bakteri yang di inokulasi, pH substrat di dalam *plate*, viskositas agar, kondisi penyimpanan agar, waktu inkubasi dan aktivitas metabolismik dari bakteri. Michel *et al* (2003) mengatakan bahwa selain sifat antimikrobal dari suatu bahan , proses solubilitas dan difusibilitas juga ikut berperan di dalam keefektifan suatu bahan.

2.6 SITOTOKSISITAS

Suatu bahan yang digunakan di dalam tubuh idealnya harus bersifat biokompatibel, tidak toksik, tidak menimbulkan iritasi, tidak karsinogenik dan tidak menimbulkan reaksi alergi (Anussavice, 2003). Salah satu cara uji untuk menentukan efek toksik suatu bahan atau obat adalah uji sitotoksitas pada suatu jaringan. Uji sitotoksitas adalah bagian dari evaluasi bahan termasuk bahan kedokteran gigi yang diperlukan untuk prosedur *screening standart* yang bertujuan untuk mengetahui efek toksik suatu bahan secara langsung terhadap kultur sel. Untuk menguji sitotoksitas bahan dan obat di bidang kedokteran gigi, dapat digunakan sel *Baby Hamster Kidney* -21 (BHK-21) yang berasal dari fibroblas ginjal bayi *hamster* dan sel L-929 yang berasal dari fibroblast paru tikus (Freshney, 1987).

2.7 KULTUR SEL

Kultur sel membutuhkan media untuk tumbuh atau berkembang biak secara *in vitro*. Pertumbuhan sel dilakukan dengan cara mitosis yaitu suatu aktifitas sel untuk membagi nucleus dan sitoplasma menjadi dua, melalui tahapan proses antara lain interfase, profase, metaphase, anaphase dan telofase. Untuk dapat mendukung terjadinya mitosis, diperlukan persyaratan dari media kultur yang disesuaikan dengan media kehidupan sel secara *in vitro*, sedang bahan kultur harus sesuai dengan bagian tubuh yang akan dijadikan perlakuan. Bahan kultur dapat berasal dari kultur organ (femur embrio mencit) dan kultur sel (sel fibroblas ginjal hamster) (Maat,1999).

Berdasarkan sumber bahan yang di kultur dan metode kultur yang digunakan, kultur sel dibagi menjadi :

a. Kultur primer (*primary culture*)

Kultur dari bahan yang diambil secara langsung dari hewan atau manusia, dapat berupa organ jaringan maupun sel. Umumnya kultur primer berumur pendek artinya hanya dapat dilakukan subkultur beberapa kali saja dan setelahnya akan mati.

b. Kultur sel diploid (*Diploid cell culture*)

Kultur dari sel diploid berasal dari hasil kultur sel primer dan dapat dilakukan subkultur sampai sebanyak 50 – 70 kali.

c. Kultur sel kontinyu (*continuous cell culture*)

Kultur dari sel yang telah mengalami transformasi atau yang berasal dari sel neoplasma, umumnya dapat disubkultur sampai tidak terbatas (Freshney,1987).

Metode kultur sel sering digunakan untuk pengujian efek biologi pada tingkat awal dari suatu bahan yang digunakan pada kedokteran gigi untuk mengetahui toksisitas bahan. Uji sitotoksitas mempunyai keuntungan antara lain : dapat memberikan hasil yang cepat, dapat mengukur toksisitas secara kuantitatif, respon sel dapat diamati secara langsung (Freshney, 1987; Levebvre & Schuster, 1994; Yuliati, 2004).

2.8 SEL FIBROBLAS

Sel fibroblast merupakan sel yang dominan dari pulpa dan ligament periodontal. bentuknya seperti spindle dengan inti berbentuk oval dan berukuran besar dan kromatin halus serta prosesus sitoplasma yang panjang. Bila sel bertambah tua bentuk sel bertambah bulat dengan inti bulat dan prosesus sitoplasma memendek. Perubahan bentuk ini disebabkan oleh bentuk pengurangan sel karena bertambah tua. Fibroblas adalah sel mesenkim dasar jaringan dewasa yang berfungsi mensintesa komponen-komponen jaringan pengikat yaitu kolagen dan matrik juga berperan dalam degradasi kolagen sehingga menghasilkan perubahan serabut utama yang konstan dan memelihara jaringan periodontal yang sehat serta deposisi jaringan yang mengapur seperti saat proses *remodelling* (Grossman et al,1995).

Secara umum sel fibroblast berperan di dalam penyembuhan luka karena sel fibroblast dapat mengadakan proliferasi dan migrasi ketempat daerah yang luka, selain itu juga mensekresi sejumlah matriks ekstraseluler yang membentuk jaringan parut yang menutup luka. Fibroblas dapat membuat dentikel dan dapat berkembang untuk menggantikan odontoblas yang mati. Dan sanggup membentuk dentin reparatif pada jaringan pulpa (Walton & Torabinej, 1997).

2.9 ESEI MTT

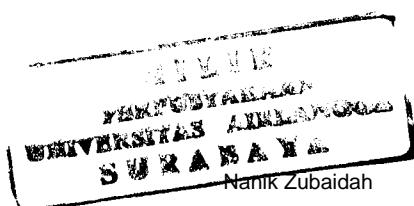
Uji Sitotoksitas suatu bahan dapat dilakukan dengan menggunakan uji enzimatik dengan esei MTT [3-(4,5- *dimethylthiazol-2yl*), 2,5-*diphenyltetrazolium bromide*]. MTT esei mengukur kemampuan sel hidup berdasarkan aktivitas mitokondria dari kultur sel yang dapat mereduksi garam tetrazolium bromide berwarna kuning menjadi suatu endapan formazan berwarna biru ungu yang tidak larut. Produk endapan formazan tersebut dilarutkan dengan pelarut agar dapat terdeteksi. Dengan demikian jumlah sel hidup yang terdeteksi dengan spektrofotometer sebagai kadar hasil produk MTT. Semakin pekat warna biru – ungunya, semakin tinggi nilai absorbennya, dan semakin banyak jumlah sel hidup (Fernandes & Vetviaeka, 1995; Siregar,2000). Esei ini banyak digunakan untuk mengukur proliferasi seluler secara kuantitatif atau untuk mengukur jumlah sel yang hidup. Keuntungan esei ini adalah pengukurannya akurat dan sensitif karena menggunakan alat spektrofotometer yang dapat mendeteksi perubahan metabolisme secara jelas, mudah manipulasinya, peralatan yang digunakan biasa tersedia di laboratorium, menghemat waktu, tenaga, tidak menggunakan isotop radioaktif. Berdasarkan alasan tersebut maka dalam penelitian ini untuk pengujian sitotoksitas bahan kedokteran gigi digunakan esei MTT menggunakan kultur sel jenis fibroblas dari *Baby Hamster Kidney-21* (BHK-21) dengan pertimbangan jenis sel ini berasal dari sel embrio sehingga mudah tumbuh dan mudah dilakukan sub kultur ulang, mempunyai sifat stabil, tidak mutasi dan sensitif (Freshney, 1987; Dash, 2002; Yuliati, 2004).

BAB 3**KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN****3.1 Kerangka konseptual Penelitian**

Di klinik kalsium hidroksida digunakan dalam bentuk pasta, sebagai dresing intrakanal pada perawatan endodontik karena bersifat antimikrobial dan bekerja pada pH alkalis 12,5. Syarat dresing intrakanal antara lain: mempunyai sifat antimikrobial yang tinggi, tidak toksik dan tidak mengiritasi jaringan. Sebagian besar bakteri endodontopatogen tidak dapat hidup dalam lingkungan alkalis yang tinggi. Perubahan pH lingkungan yang tinggi dari jaringan yang radang di dalam daerah periapikal menghasilkan efek baktericidal (Siqueira & Lopes, 1999).

Standart yang digunakan untuk evaluasi obat saluran akar didalam perawatan endodontik adalah daya antimikrobial dan sifat sitotoksitas. Aktifitas antimikrobial dari kalsium hidroksida dihubungkan dengan tingginya pH. pH yang tinggi akan melepas ion hidroksil. Ion hidroksil adalah oksidan radikal bebas tinggi yang sangat reaktif dan dapat membunuh bakteri. Efek membunuh bakteri dengan merusak membran sitoplasma bakteri, selanjutnya mengakibatkan denaturasi protein, inaktivasi enzim dan terjadi kerusakan DNA sehingga menyebabkan kematian bakteri (Siqueira & Lopes, 1999; Hosoya *et al*, 2001).

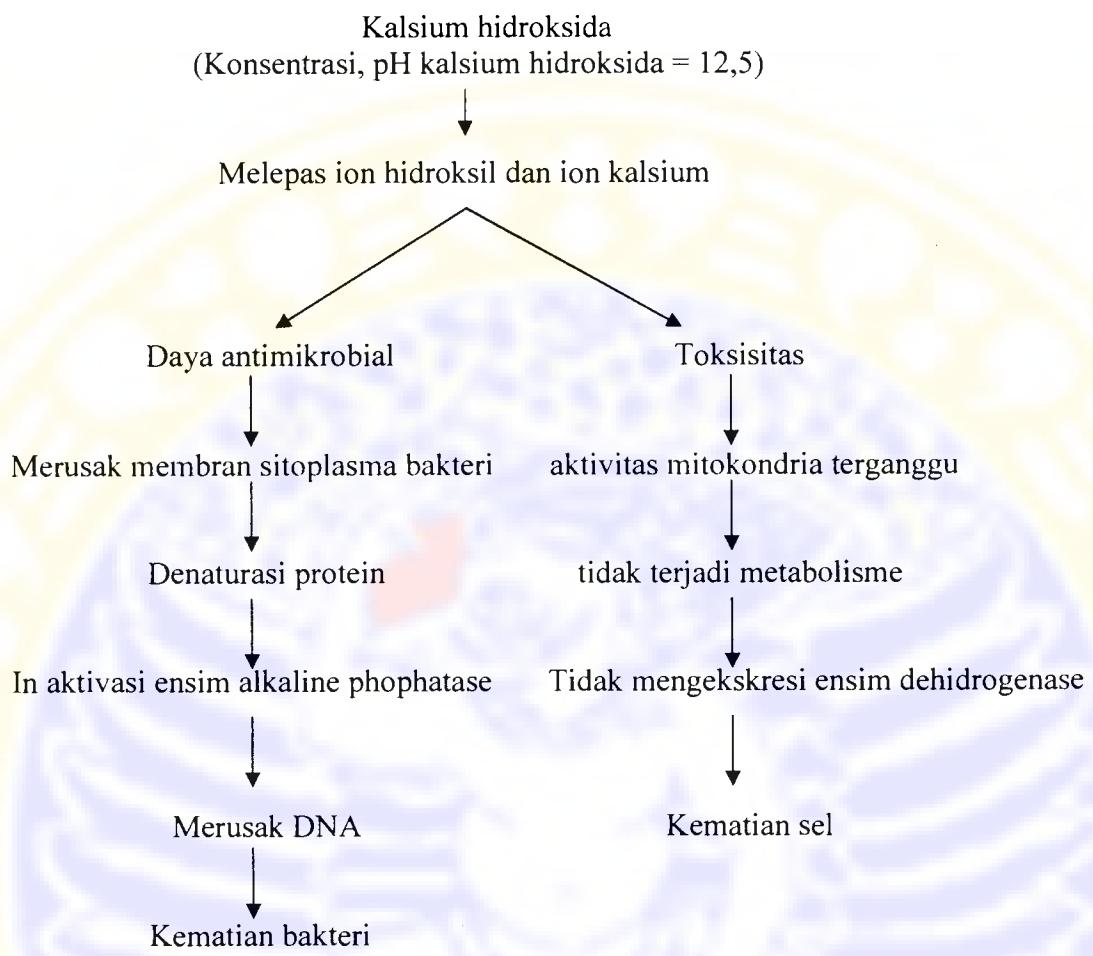
Stock & Nehammer (1990) mengatakan bahwa dengan menggunakan dresing intrakanal yang mempunyai khasiat antimikrobial yang kuat, tidak hanya membunuh bakteri tetapi juga dapat menimbulkan iritasi atau toksik pada jaringan periapikal dan jaringan hidup yang sehat serta dapat menghambat kesembuhan. Efek toksik dari



bahan endodontik yang digunakan sebagai *sealer* maupun dresing intrakanal, jika kontak secara langsung dengan dinding saluran akar dapat merusak jaringan sekitarnya (Geurtsen and Leyhausen, 1997).

Pada umumnya mekanisme antimikrobial akibat penggunaan dresing intrakanal kalsium hidroksida antara lain merusak membrane sitoplasma bakteri, denaturasi protein, inaktivasi ensim *alkaline phosphatase*, merusak DNA yang akhirnya terjadi kematian bakteri.

Efek toksik dari kalsium hidroksida atau bahan endodontik pada umumnya dapat diketahui berdasarkan aktivitas mitokondria sel. Mitokondria dari sel hidup sangat berperan penting dalam mengekskresi ensim dehidrogenase. Apabila aktivitas mitokondria terganggu karena adanya jejas atau efek toksik dari suatu bahan maka tidak dapat mengekskresi ensim dehidrogenase sehingga metabolisme sel terganggu dan mengakibatkan kematian sel (Yuliati, 2005; Meizarini, 2005).



BAB 4

METODE DAN MATERI PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian : eksperimental laboratorium

4.2 Rancangan Penelitian : *The post test only Controled group design*

4.3 Unit Penelitian:

4.3.1 Sampel Penelitian : kalsium hidroksida

Besar sampel didapat dengan rumus Lemeshow, (1990)

$$2 \sigma^2 \cdot (Z_{1/2} \alpha + Z\beta)^2$$

$$n' = \frac{(2 \cdot (0,45)^2 \cdot (1,96 + 0,84)^2)}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$$

$$n' = \frac{2 \cdot (0,45)^2 \cdot (1,96 + 0,84)^2}{(13,80 - 13,2)^2}$$

$n' = 8,12$ dibulatkan menjadi 8

Keterangan:

$Z_{1/2} \alpha$ = adjusted standard deviation dari $1/2 \cdot \alpha$

$Z\beta$ = adjusted standard deviation dari β

σ = standard deviation dari respons kelompok kontrol

μ_1 = rata-rata hitung respons 1 hasil penelitian pendahuluan

μ_2 = rata-rata hitung respons kelompok 2 hasil penelitian pendahuluan

4.3.2 Variabel penelitian

- Variabel bebas : konsentrasi kalsium hidroksida
- Variabel tergantung : zona hambatan, sel hidup
- Variabel terkendali : cara kerja penelitian

4.4 Kelompok sampel

Sampel pasta kalsium hidroksida dibagi dalam 5 kelompok untuk uji antimikrobial dan uji sitotoksitas yang terdiri dari :

- Kelompok I : kalsium hidroksida dengan konsentrasi 50%
- Kelompok II : kalsium hidroksida dengan konsentrasi 55 %
- Kelompok III : kalsium hidroksida dengan konsentrasi 60 %
- Kelompok IV : kalsium hidroksida dengan konsentrasi 65 %
- Kelompok V : kalsium hidroksida dengan konsentrasi 70%

4.5 Definisi Operasional Variabel

- a. Pasta kalsium hidroksida adalah suatu bentuk campuran antara bubuk kalsium hidroksida dengan aquabides steril melalui reaksi kimia dan physik sebagai berikut : $\text{CaO} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ca(OH)}_2$
- b. Konsentrasi adalah perbandingan antara berat dan volume (gram / mililiter).
- c. Uji Antimikrobial adalah suatu uji sensitivitas suatu bahan atau obat terhadap bakteri, dengan melihat zona hambatan. Zone hambatan adalah daerah yang tidak ada pertumbuhan kuman disekitar sampel, diukur dengan alat jangka sorong dengan ketelitian 0,5 dalam satuan mm.
- d. Esei MTT adalah suatu metode yang digunakan untuk menguji toksitas suatu bahan yaitu menghitung absorbsi sel hidup dengan menggunakan alat spektrofotometer untuk menentukan optikal densitas (absorben) sel. Besar absorben menunjukkan sel yang hidup.

4.6 Bahan Penelitian

1. Bubuk kalsium hidroksida murni (No. M2047. Merck, Darmstadt, Germany)
2. Akuabides steril (Kimia Farma).
3. Kultur sel fibroblas (BHK-21), stock Pusvetma pasase 52.
4. Larutan *trypsin versene*
5. Media Rosewell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 yang berisi Hepes 6gram /lt; NaHCO₃ 2 gram / lt; FCS 100ml; Fungison 1,25 ml; Pen strep 100ml.
6. Bovine serum 10%
7. Larutan PBS (Phosphat Buffer Saline) berisi : NaCl 8 gram; KCl 0,2 gram; Na₂HPO₄ 1,15 gram; KH₂PO₄ 0,2 gram di dalam akuabides 1 liter.
8. MTT (Sigma Cat. No.M-5655)
9. Media *Brain Heart Infusion* (BHI)
10. Media *Chocolate Agar*
11. Larutan PZ (NaCl 0,85%)
12. *S. Viridans* (di isolasi langsung dari penderita).
13. *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO) (MP Biomedical,LLC. Katalog 190186. Lot.R.19953)



Gambar 4.1: Bahan yang digunakan untuk uji toksisitas

- a) Media RPMI campuran;
- b). Larutan bovine serum;
- c)Larutan MTT;
- d) Larutan PBS;
- e). Bubuk MTT;
- f). Larutan versin tripsin;
- g) Media RPMI murni.

4.7 Alat Penelitian

1. Pinset
2. *Excafator*
3. Petridish
4. Rak tabung reaksi
5. Oase
6. Inkubator
7. 96 lempeng kultur sel (mikroplate)
8. Botol roux

9. Spektrofotometer 595nm

10. Pipet mikro

11. Appendorf

4.8 Lokasi penelitian

1. Pengambilan bakteri *S. viridans* di klinik Spesialis Konservasi Gigi Rumah Sakit Gigi dan Mulut Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.
2. Uji antimikrobal dilakukan di Laboboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Dr.Soetomo Surabaya.
3. Uji sitotoksitas dilakukan di Laboratorium TDC Unair dan Pusat Veterina Viafarmia (PUSVETMA).

4.9 Prosedur Penelitian

4.9.1 Uji antimikrobal

a. Pembuatan konsentrasi kalsium hidroksida

Pembuatan pasta kalsium hidroksida dengan masing-masing konsentrasi 50%, 55%, 60 %, 65 % dan 70%. Cara mencampur: bubuk ditimbang dengan alat timbangan analitik lebih dahulu sesuai dengan berat yang diinginkan, dicampur dengan aquabides steril sesuai konsentrasi yang diinginkan sampai mencapai bentuk pasta. Hasil pencampuran dilakukan didalam tabung *eppendorf* dan diaduk dengan memakai *cement spatel* steril selama 1 menit kemudian dilakukan homogenisasi dengan alat vortex selama 30 detik (Estrela, 1998).

b. Isolasi *S. viridans*

Isolasi *S. viridans* diambil di Klinik Spesialis Konservasi Gigi Rumah Sakit Gigi dan Mulut Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya. Sampel spesimen dari gigi anterior rahang atas penderita yang mengalami nekrosis dengan disertai kelainan periapikal. Sterilisasi semua alat dengan *dry heat sterilisator* dalam suhu 160° C selama 1 jam perlakuan. Pertama dilakukan isolasi pada gigi nekrosis dengan *rubber dam*, permukaan gigi diulas dengan alkohol 70 %. Dibuat *cavity entrance* dengan bur bulat steril sampai atap pulpa hilang. Paper point steril dimasukkan ke dalam saluran akar, ditunggu 1 menit. Kemudian paper point dimasukkan ke dalam tabung biakan *Brain Heart Infusion* (BHI). Media biakan dieramkan pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya bakteri dalam tabung (spesimen) diambil dengan oase untuk diinokulasi ke media padat darah dalam *plate*.

Media agar darah dalam *plate* dieramkan selama 24 jam dalam inkubator dengan 37° C. Setelah 24 jam, dilihat adanya pertumbuhan bakteri, dengan menggunakan mikroskop cahaya. Untuk melihat adanya pertumbuhan bakteri dengan bentuk kokus gram (+), berderet seperti rantai, α hemolysa dilakukan penanaman lagi ke media *Chocolate agar* suhu 37°C selama 24 jam kemudian dilakukan pengecatan.

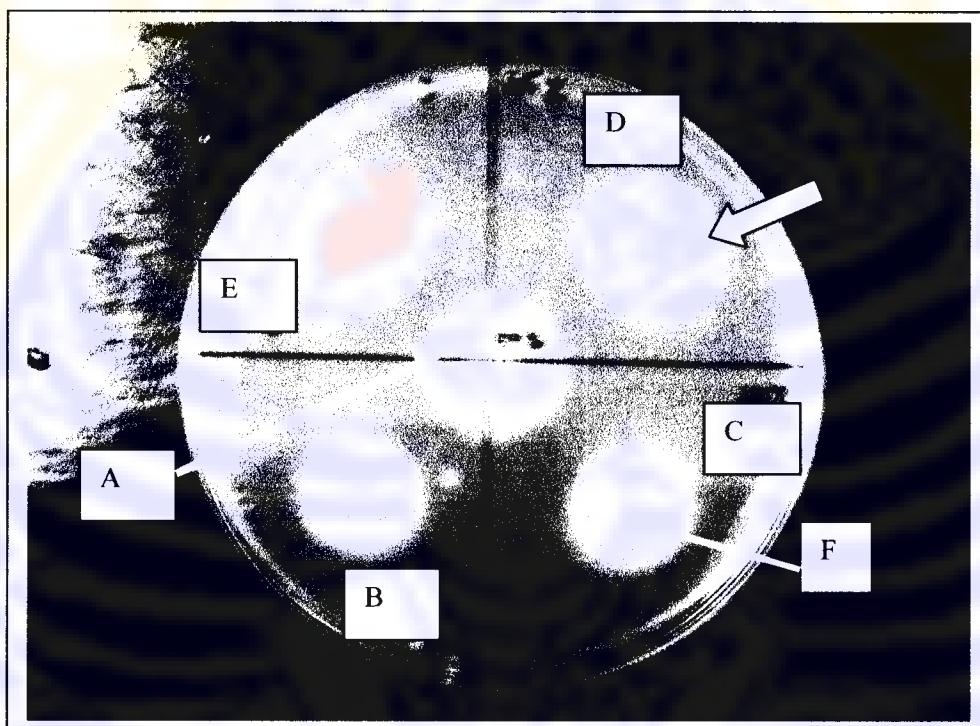
c. Identifikasi bakteri *S.viridans* dengan pengecatan gram

Spesimen diambil dari bagian *plate* yang menunjukkan pertumbuhan dengan memakai oase dengan cara usapan kemudian diulaskan pada *obyek glass*. Preparat pada *obyek glass* di panaskan diatas api spiritus, kemudian preparat ditetesi sampai merata dengan *gentian violet* ditunggu sampai 3 menit. Cat dibuang kemudian ditetesi larutan *lugol* sampai merata dan ditunggu selama 1 menit. Dilakukan pelunturan dengan alkohol dan kemudian dibilas / disiram dengan air. Setelah itu ditetesi dengan air *fuchsin* sampai merata dan ditunggu selama 2 menit lalu dibilas dengan air dan dikeringkan. Preparat dilihat dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000x. Bakteri akan tampak pada lapang pandang berupa bentukan kokus, gram (+), berderet seperti rantai dan ditumbuhkan lagi di media *chocolate agar*.

d. Cara kerja uji antimikrobial

Pembuatan larutan suspensi dilakukan dengan cara mengambil 1 koloni bakteri *S.viridans* dengan menggunakan oase, kemudian dicampur dengan larutan garam faali (NaOCl 0,85%) sampai kekeruhan setara dengan standart *Mc.Farland* 0,5 yang berarti mengandung bakteri $1,5 \times 10^8$ sel / ml (Baron *et al*, 1994). Pengambilan 1 ml suspensi bakteri *Streptococcus viridans* kemudian dimasukkan ke dalam petridish yang berisi Media *Muller Hinton Agar*, diratakan dengan spreader steril. Setelah merata dibuat sumuran dengan cara meletakkan cincin platinum yang berukuran diameter 6 mm dan tinggi 9 mm dari permukaan. Sampel pasta kalsium hidroksida dengan masing-masing konsentrasi 50 % kelompok I, 55% (kelompok II), 60 % (kelompok III), 65 % (kelompok IV), 70 % (kelompok V) dimasukkan

menggunakan pipet sebanyak 25 μl ke dalam sumuran yang telah dibuat di dalam media *Muller Hinton Agar*, kemudian diinkubasi 37 $^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam (hasil penelitian pendahuluan). Hasil zone hambatan yang terjadi diukur diameternya dengan alat jangka sorong dengan ketelitian 0,5 dalam satuan milimeter (Wistreich and Lechtman, 1980) (lihat gambar 4.2).



Gambar 4.2 : Zona Hambatan pada uji antimikrobal Kalsium hidroksida.
(A) Kalsium hidroksida konsentrasi 50%, (B) 55%, (C) 60%
(D) 65% , (E) 70%. (F) Bentukan pasta Kalsium hidroksida

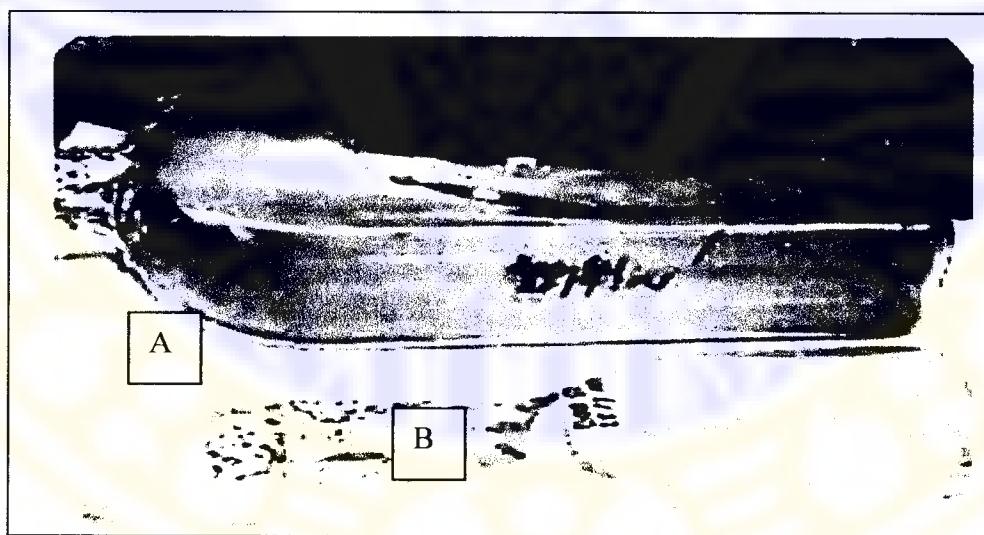
4.9.2 Uji Sitotoksitas

a. Tahap pembuatan ekstrak kalsium hidroksida

Bubuk kalsium hidroksida yang telah ditimbang lebih dahulu sesuai berat masing-masing konsentrasi, di sterilisasi dengan sinar ultra violet selama 30 menit. Bubuk kalsium hidroksida dicampur dengan akuabides steril diaduk sampai homogen selama 1menit Kemudian campuran tersebut dimasukkan dalam *plate* sebanyak 320 μl dan diinkubasi selama 1 jam suhu 37° C. Tahap berikutnya campuran tersebut dimasukkan ke dalam 640 μl media RPMI-1640 dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Larutan tersebut difilter dengan 0,2 μm (Minisart). Hasil ekstrak filter tersebut digunakan sebagai sampel penelitian.

b. Cara kerja uji sitotoksitas kalsium hidroksida

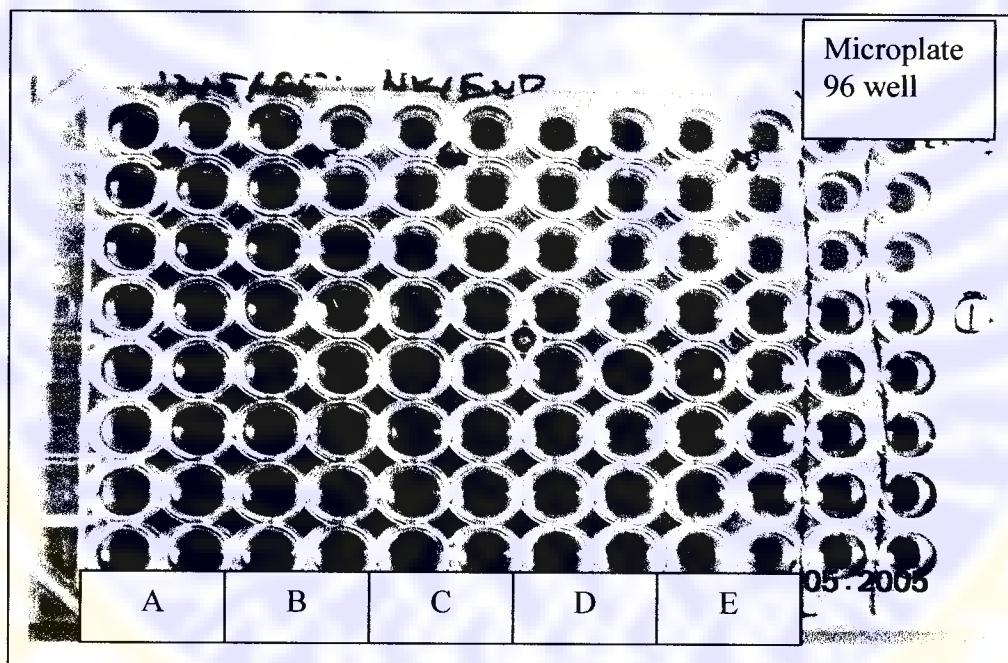
Kultur sel (BHK-21) dalam bentuk *cell-line* ditanam dalam botol *roux* (lihat gambar 4.3).



Gambar 4.3 : A dan B, Sel Fibroblas di dalam botol Roux

Setelah *confluent*, kultur dipanen dengan menggunakan larutan *trypsinase versene*. Hasil panen diambil sedikit dan ditanam kembali dalam media *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI -1640) yang mengandung 10 % fetal bovine serum albumin diinkubasi selama 24 jam suhu 37° C. Kemudian sel dipindahkan dalam botol kecil (*roux*) dan dibuat dengan kepadatan 2×10^5 sel/ml, sel tersebut siap digunakan untuk pengujian sampel.

Pengujian sitotoksitas menggunakan lempeng kultur sel 96 sumuran beralas datar (Lihat gambar 4.4).



Gambar 4.4 : Uji sitotoksitas yang dilakukan pada lempeng 96 sumuran

Keterangan: Kalsium hidroksid konsentrasi A = 50%, B= 55%,
C= 60%, D= 65%, E= 70%.

Pengujian sitotoksitas dilakukan sesuai standart protocol untuk eseai MTT (Dash., 2002). Setiap sumuran berisi sel + media RPMI sebanyak 100 μl dengan kepadatan 2×10^5 sel/ml sebanyak 50 μl . Sampel ekstrak pasta kalsium hidroksida sebelum diuji disterilkan dahulu dengan ultra violet selama 15 menit, selanjutnya sampel dimasukkan dalam lempeng sumuran sebanyak 50 μl . Pada penelitian ini pengujian dilakukan secara duplo (dua kali). Kemudian lempeng sumuran diinkubasi selama 20 jam pada suhu 37°C . Setelah itu setiap sumuran diisi 25 μl dari 5 mg /ml MTT yang telah dilarutkan dalam PBS, diinkubasi kembali selama 4 jam suhu 37°C . Selanjutnya setiap sumuran ditambahkan 50 μl DMSO. Lempeng sumuran diinkubasi kembali selama 5 menit pada suhu 37°C . Kemudian lempeng sumuran dibaca pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 595 nm (Lihat gambar 4.5).



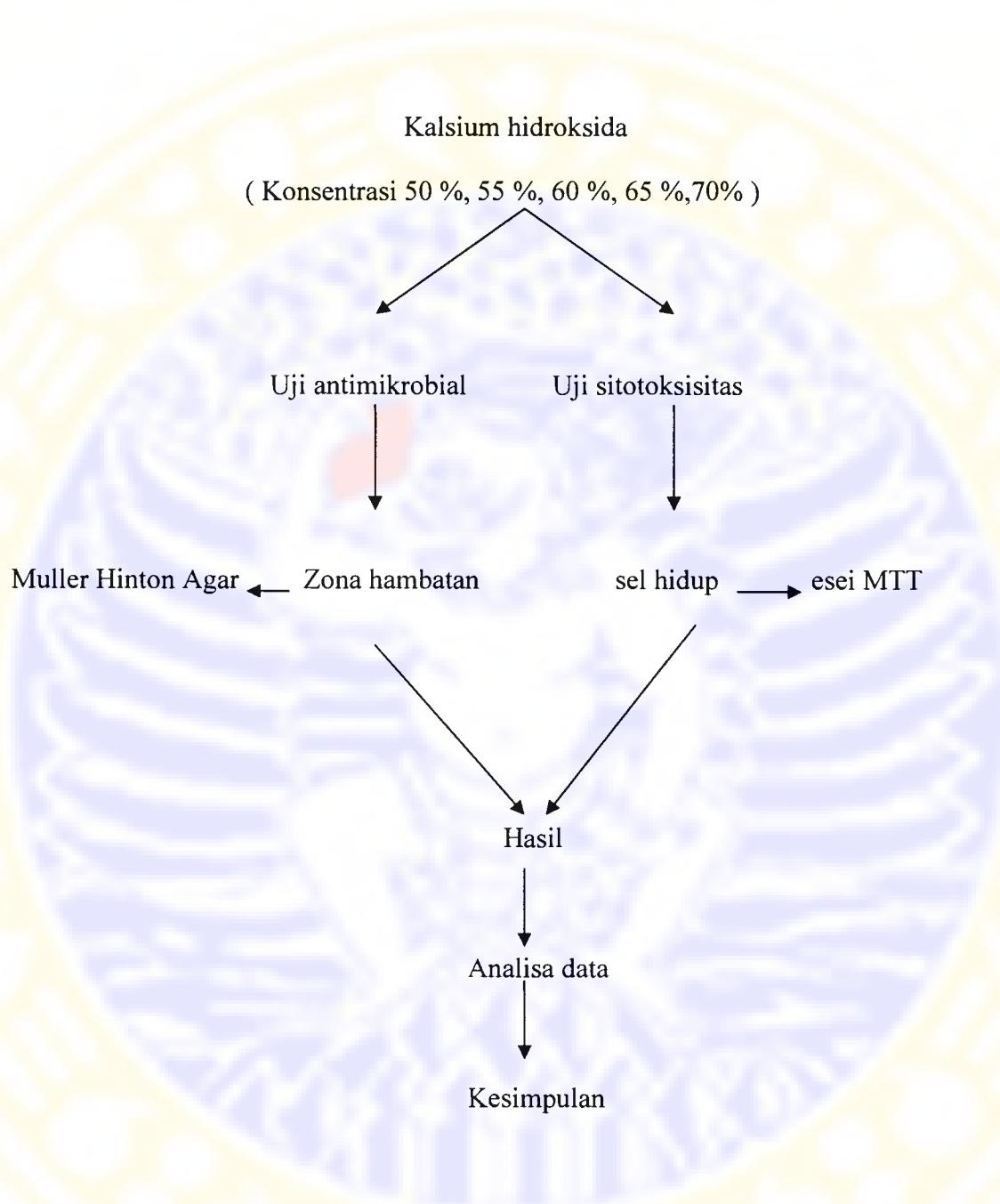
Gambar 4.5. Perangkat ELISA *Reader* yang menggunakan dasar spektrofotometri

Hasil yang diperoleh dinyatakan dalam optikal densitas (absorben). Besar absorben setiap sumuran menunjukkan jumlah sel hidup dalam kultur media (Anita,2005).

4.10 Analisa statistik

Pada penelitian ini diperoleh data nilai dari hasil pengukuran zone hambatan dari uji antimikrobal yang menggunakan metode difusi agar dengan bakteri uji *S. viridans* dan pengukuran jumlah sel hidup dari uji sitotoksitas yang menggunakan uji enzimatik dengan metode MTT [3-(4,5-dimethyl thiazol-2yl), 2,5 diphenyl tetrazolium bromide]. Sampel penelitian ini dibagi dalam 5 kelompok yang terdiri dari kelompok I (50%), II (55%), III (60%), IV (65%), V (70%) yang masing-masing terdiri dari 8 sampel. Data yang diperoleh di uji menggunakan statistik ANOVA satu arah dengan batas kemaknaan $\alpha = 5\%$ kemudian dilanjutkan dengan LSD (*Least Significant Difference*).

4.11 ALUR PENELITIAN



BAB. 5

ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1. DATA UJI ANTIMIKROBIAL

Penelitian tentang daya antimikrobial kalsium hidroksida terhadap bakteri *S. viridans* yang dilakukan pada 40 sampel yang terbagi dalam 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 8 sampel. Kelompok I kalsium hidroksida dengan konsentrasi (50%); kelompok II (55%); kelompok III (60%); kelompok IV (65%); kelompok V (70%).

Rerata dan standart deviasi zona hambatan dari kalsium hidroksida dengan berbagai konsentrasi terhadap *S. viridans* dapat dilihat pada tabel 5.1.

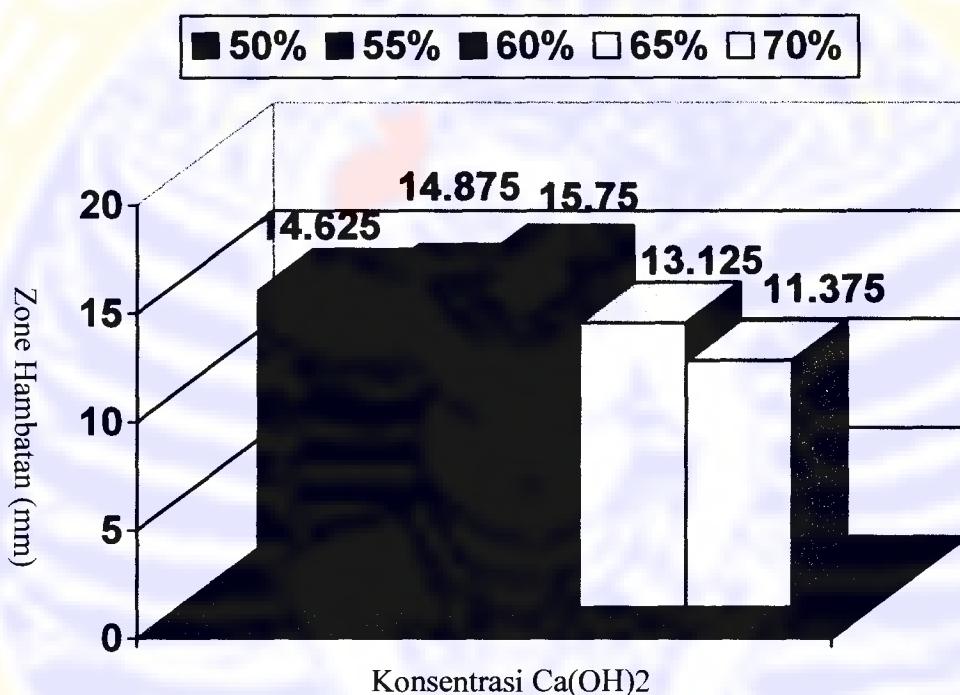
Tabel 5.1 : Hasil rerata dan standart deviasi diameter zona hambatan kalsium hidroksida dengan berbagai konsentrasi terhadap bakteri *S. viridans* (mm).

Konsentrasi	N	X	SD
Kelompok I (50%)	8	14,6250	1,1877
Kelompok II (55%)	8	14,8750	1,6421
Kelompok III (60%)	8	15,7500	1,4880
Kelompok IV (65%)	8	13,1250	1,1260
Kelompok V (70%)	8	11,3750	1,1877

Keterangan :

n = jumlah sampel; X = rerata zona hambatan; SD = Standart Deviasi

Pada uji antimikrobal didapatkan suatu grafik rerata zona hambatan kalsium hidroksida dengan berbagai konsentrasi (50%, 55%, 60%, 65% dan 70%) terhadap bakteri *S. viridans*. Hasil menunjukkan bahwa kalsium hidroksida dengan konsentrasi 60% mencapai puncak zona hambatan yang paling tinggi dibanding dengan konsentrasi yang lain. Hal ini terlihat pada gambar 4.6.



Gambar 4.6 : Grafik rerata zona hambatan kalsium hidroksida dengan berbagai konsentrasi terhadap bakteri *S. viridans*.

Pada tabel 5.1 dapat terlihat pada kelompok III (60%) menunjukkan nilai zona hambatan yang paling tinggi, sedangkan kelompok V (70%) menunjukkan nilai zona hambatan yang paling rendah, bila dibanding dengan kelompok lainnya.

Data yang diperoleh pada tabel 5.1 dilakukan uji homogenitas dengan *Levene Statistic* dan diperoleh nilai $p= 0,745$ ($p>0,05$), artinya data homogen dan berdistribusi normal yang diuji dengan *One Sample Kolmogorov Smirnov Test*. Perbedaan zona hambatan kalsium hidroksida terhadap bakteri *S.viridans* dilakukan perhitungan statistik dengan menggunakan ANOVA satu arah dengan batas kemaknaan $\alpha = 5\%$ (Tabel 5.3).

Tabel 5.2 Hasil uji ANOVA satu arah diameter zona hambatan kalsium hidroksida dengan berbagai konsentrasi.

	JK	Db	RK	F	Sig
Antar kelompok	94,900	4	23,725	13,181	0,000
Dalam kelompok	63,000	35	1,800		
Jumlah	157,900	39			

Keterangan:

JK : Jumlah kwadrat; Db : Derajat bebas; RK: Rerata kwadrat; F: F hitung
Sig : Significant

Hasil analisis Anova didapatkan significant = 0,000 ($p<0,05$) ini menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna pada zona hambatan kalsium hidroksida dengan berbagai macam konsentrasi terhadap bakteri *S.viridans*. Penentuan ada perbedaan antar perlakuan dilakukan uji *Least Significant Difference* (LSD) seperti terlihat pada tabel 5.3.

Tabel 5.3 : Hasil uji LSD diameter zona hambatan kalsium hidroksida dengan berbagai konsentrasi terhadap bakteri *Streptococcus viridans*.

Konsentrasi	Kel. I (50%)	Kel. II (55%)	Kel.III (60%)	Kel.IV (65%)	Kel.V (70%)
Kel. I (50%)	—	0,712	0,102	0,032*	0,000*
Kel. II (55%)		—	0,201	0,013*	0,000*
Kel. III (60%)			—	0,000*	0,000*
Kel. IV (65%)				—	0,013*
Kel. V (70%)					—

Catatan: Kel. = Kelompok; * = Berbeda bermakna ($p < 0.05$).

Kelompok III (60%) jika dibandingkan dengan kelompok II (55%) tidak ada perbedaan bermakna pada zona hambatan dengan nilai $p > 0,05$. Kelompok IV (65%) dan V (70%) jika dibanding dengan kelompok II (55%) menunjukkan ada perbedaan bermakna pada zona hambatan dengan nilai $p < 0,05$.

Kelompok IV (65%) dan kelompok V (70%) jika dibanding dengan kelompok III (60%) menunjukkan ada perbedaan bermakna pada zona hambatan dengan nilai $p < 0,05$. Pada kelompok V (70%) jika dibanding kelompok IV (65%) menunjukkan ada perbedaan bermakna pada zona hambatan dengan nilai $p < 0,05$.

5.2 DATA UJI SITOTOKSISITAS

Penelitian uji sitotoksitas kalsium hidroksida terhadap sel fibroblast BHK-21 dilakukan pada 40 sampel, terbagi dalam 5 kelompok yaitu kelompok I (50%),

kelompok II (55%), kelompok III (60%), kelompok IV (65%) dan kelompok V (70%). Rerata dan standart deviasi uji sitotoksitas pada kalsium hidroksida dengan berbagai konsentrasi terhadap sel fibroblast BHK-21 dapat dilihat pada tabel 5.4.

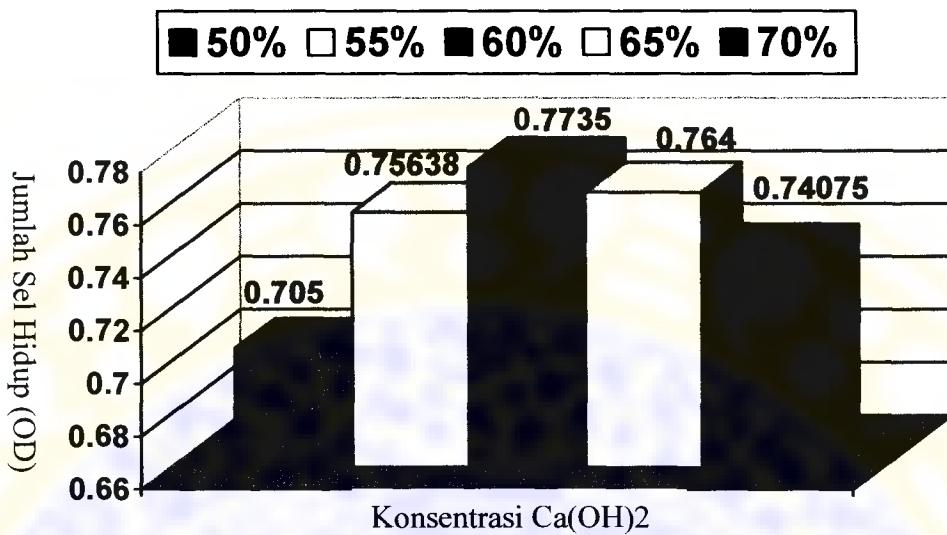
Tabel 5.4. Hasil rerata dan standart deviasi uji sitotoksitas pada kalsium hidroksida dengan berbagai konsentrasi terhadap sel fibroblas BHK-21 (OD).

Konsentrasi	N	X	SD
50% Kelompok I	8	0,70500	0,075848
55% Kelompok II	8	0,75638	0,092657
60% Kelompok III	8	0,77350	0,091147
65% Kelompok IV	8	0,76400	0,070751
70% Kelompok V	8	0,74075	0,076282

Keterangan:

n = jumlah sample; X = rerata jumlah sel hidup; SD= Standart deviasi

Pada uji sitotoksitas didapatkan suatu grafik rerata kalsium hidroksida dengan berbagai konsentrasi (50%, 55%, 60%, 65% dan 70%) terhadap sel fibroblas (BHK-21). Hasil menunjukkan bahwa kalsium hidroksida dengan konsentrasi 60% mencapai jumlah sel hidup yang paling tinggi dibanding dengan konsentrasi yang lain. Hal ini dapat terlihat pada gambar 4.7.



Gambar 4.7 : Grafik rerata sel hidup uji sitotoksitas kalsium hidroksida dengan berbagai konsentrasi terhadap sel fibroblast (BHK-21).

Pada tabel 5.4 terlihat bahwa pada uji sitotoksitas kalsium hidroksida terhadap sel fibroblas (BHK-21) pada 5 kelompok penelitian yang masing-masing terdiri dari 8 sampel. Pada kelompok III (60%) menunjukkan nilai rerata jumlah sel hidup paling tinggi yaitu 0,77350, sedangkan pada kelompok I (50%) menunjukkan nilai rerata jumlah sel hidup paling rendah yaitu 0,70500. Data yang diperoleh pada tabel 5.4 diuji homogenitas dengan *Lavene Statistic*, diperoleh nilai $p=0,557$ ($p>0,05$). Berarti data tersebut homogen. Data tersebut juga distribusi normal yang diuji dengan *One Sample Kolmogorov Smirnov Test*.

Untuk mengetahui perbedaan antar kelompok dari sitotoksitas kalsium hidroksida terhadap sel fibroblast BHK-21 dilakukan perhitungan statistik dengan menggunakan ANOVA satu arah dengan batas kemaknaan $\alpha = 5\%$ (Tabel 5.5).

Tabel 5.5 : Hasil ANOVA satu arah uji sitotoksitas pada kalsium hidroksida dengan berbagai konsentrasi terhadap sel fibroblas BHK-21

	JK	Db	RK	F	Sig
Antar kelompok	0,02,302	4	0,005756	0,988	0,427
Dalam kelompok	0,204	35	0,005826		
Jumlah	0,227	39			

Keterangan:

JK : jumlah kwadrat; Db : derajat bebas; RK: rerata kwadrat; F: F hitung;
Sig :Significant

Hasil analisa Anova satu arah diperoleh tidak ada perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan dengan $p > 0,05$.

BAB. 6

PEMBAHASAN

6.1 UJI ANTIMIKROBIAL

Pada perawatan endodontik diperlukan pemberian suatu dresing intrakanal setelah dilakukan preparasi saluran akar yang meliputi *cleaning* dan *shapping*. Tindakan ini bertujuan untuk mendapatkan saluran akar yang steril, bebas dari bakteri anaerob maupun bakteri fakultatif anaerob. Bakteri yang dominan ditemukan di dalam saluran akar adalah bakteri *S.viridans* yang hidup secara fakultatif anaerob. Kalsium hidroksida telah diperkenalkan sebagai dresing intrakanal pada perawatan endodontik karena mempunyai pH alkalis 12,5 dan bersifat antimikrobial yang tinggi (Grossman,1995, Morrier,2003).

Daya antimikrobial suatu bahan atau obat dapat diketahui dengan melakukan uji sensitivitas (uji kepekaan) terhadap bakteri. Uji sensitivitas dapat dilakukan dengan menggunakan metode dilusi dan difusi agar. Metode dilusi digunakan untuk menentukan kadar hambat minimal (MIC : *Minimum Inhibition Concentration*) dari suatu bahan terhadap bakteri. Metode ini menggunakan pengenceran seri yaitu kontak langsung di dalam larutan antara sel bakteri dengan bahan yang diuji (Siqueira *et al*, 1998). Sedangkan prinsip metode difusi agar berdasarkan kemampuan bahan untuk dapat berdifusi ke dalam media kultur.

Telah dilakukan penelitian tentang uji antimikrobal dari kalsium hidroksida terhadap bakteri *S.viridans*. Digunakan bakteri *S.viridans* karena bakteri tersebut ditemukan terbanyak di dalam saluran akar. Penelitian ini menggunakan metode zona hambatan dengan difusi agar. Metode analisis data dengan menggunakan ANOVA satu arah dengan derajat kemaknaan α 5%.

Pemilihan metode difusi agar ini didasarkan atas beberapa alasan, yakni metode ini dapat digunakan untuk evaluasi aktivitas obat antimikrobal yang sudah ditentukan konsentrasiannya, waktu yang dibutuhkan untuk menganalisa zona hambatan relatif singkat, alat yang digunakan cukup sederhana dan mudah diperoleh, biaya yang dibutuhkan relatif ekonomis dan yang terpenting adalah metode ini dapat mengetahui kematian bakteri terhadap suatu obat secara bertahap dengan melihat zona hambatan yang terjadi di dalam media agar. Metode ini umumnya digunakan untuk evaluasi aktivitas antimikrobal dari suatu bahan termasuk bahan endodontik (Siqueira *et al*,1997; Morrier,2003).

Di Fiore (1983), Siqueira & Uzeda (1997), Gomes *et al* (2003) mengatakan bahwa hasil uji antimikrobal dengan menggunakan metode difusi agar tergantung pada beberapa hal. Hal tersebut antara lain : ukuran molekul bahan, solubilitas dan difusibilitas dari bahan melalui medium agar, sensitifitas obat, sumber bakteri (strain atau kumpulan spesies), jumlah bakteri yang di inokulasi, pH substrat di dalam *plate*, viscositas agar, kondisi penyimpanan agar, waktu inkubasi dan aktivitas metabolik dari bakteri. Semakin tinggi daya antimikrobal suatu bahan maka semakin tinggi pula daya solubilitas dan difusibilitas suatu bahan terhadap media sehingga menghasilkan zona hambatan yang besar.

Kalsium hidroksida dengan konsentrasi 50% merupakan konsentrasi yang paling rendah karena berdasarkan hasil penelitian pendahuluan bahwa saat kalsium hidroksida dicampur dengan akuabides steril menghasilkan bentuk viskositas yang menyerupai pasta. Hal ini sesuai dengan pemakaian di klinik yang menggunakan perbandingan antara bubuk kalsium hidroksida dengan akuabides steril dengan konsentrasi 50% sesuai aturan pabrik. Gomes et al (2003) dengan menggunakan pasta kalsium hidroksida konsentrasi 50% membuktikan bahwa bakteri anaerobik gram negatif lebih peka terhadap kalsium hidroksida dari pada bakteri fakultatif anaerobik gram positif.

Kalsium hidroksida dengan konsentrasi 60% menunjukkan nilai rerata zona hambatan 15,7500 mm (tabel 5.1), yang merupakan nilai tertinggi dibanding kelompok yang lain, yang berarti bahwa diameter zona hambatan yang ditimbulkan paling besar dan dapat dikatakan mempunyai daya antimikrobal paling tinggi dibanding kelompok lain. Hal ini disebabkan oleh adanya pelepasan ion hidroksil (OH^-) dari kalsium hidroksida. Ion hidroksil (OH^-) adalah oksidant radikal bebas yang tinggi, menunjukkan reaktivitas yang kuat terhadap sel bakteri (Oztan et al,2003). Efek ion hidroksil (OH^-) ini sangat reaktif, menggabung secara cepat dengan lipid, protein, dan asam nukleat sehingga mengakibatkan peroksidase lipid, hal ini akan meningkatkan permeabilitas membran sel bakteri, selanjutnya terjadi proses denaturasi protein, inaktivasi enzim dan merusak DNA sehingga mengakibatkan terjadinya kematian dari sel bakteri (Siqueira,1998; Estrela et al,2003). Pada konsentrasi tersebut kalsium hidroksil belum mencapai titik kejemuhan

sehingga kalsium hidroksida masih mampu berdifusi ke dalam media kultur Muller Hinton agar yang telah terpapar bakteri *S. viridans*.

Pada tabel 5.3 dapat dilihat hasil uji antimikrobial kalsium hidroksida terhadap bakteri *S. viridans* sebagai berikut : kalsium hidroksida dengan konsentrasi 55% dan 60% jika dibanding dengan kelompok 50%, konsentrasi 60% dibanding dengan 55% menunjukkan tidak ada beda yang bermakna. Hal ini kemungkinan bahwa viskositas dari campuran tersebut sama sehingga ion hidroksil yang dilepas kemungkinan jumlahnya hampir sama.

Pada konsentrasi 65% dibanding dengan kalsium hidroksida dengan konsentrasi 50%, 55%, dan 60%, demikian juga pada kalsium hidroksida dengan konsentrasi 70% terhadap kalsium hidroksida dengan konsentrasi 50%, 55%, 60% dan 65% menunjukkan ada perbedaan yang bermakna pada zona hambatan terhadap *S. viridans*. Hal ini disebabkan oleh viskositas bahan yang dihasilkan dari percampuran antara bubuk kalsium hidroksida dengan akuabides steril telah mencapai puncak titik jenuh pada konsentrasi 65% dan 70%, sehingga kemungkinan ion hidroksil sulit terlepas ke dalam media agar yang berakibat jumlah ion hidroksil menurun dan zona hambatan yang ditimbulkan juga kecil. Selain itu daya diffusibilitas dan solubilitas (kelarutan) dari kalsium hidroksida ke dalam media agar sangat rendah akibat viskositas bahan yang sangat kental.

Disamping faktor tersebut masih ada faktor lain yang mempengaruhi, yaitu buffer dari media kultur juga dapat menurunkan pH yang tinggi sehingga daya antimikrobial kalsium hidroksida berkurang. Safavi & Nakayama (2000) mengatakan bahwa pengaruh dari campuran *vehicle* (pelarut) yang *non aqueous* (tidak larut dalam

air) akan mengganggu keefektifan kalsium hidroksida. Hal ini dibuktikan juga oleh Suzuki (1999) dengan mencampur kalsium hidroksida dengan *glyserin* murni atau *propylene glycol* (termasuk *vehicle* kalsium hidroksida). Kedua bahan tersebut bersifat non polar sehingga tidak menunjukkan zona hambatan dari bakteri karena keadaan larutan sudah jenuh sehingga ion hidrosil (OH^-) tidak dapat berdiffusi ke dalam media kultur agar, akibatnya jumlah ion hidrosil (OH^-) yang terlepas berkurang dan daya antimikrobial menurun.

6.2 UJI SITOTOKSISITAS

Dalam penggunaan kalsium hidroksida sebagai dresing intrakanal pada perawatan endodontik selain mengharapkan daya antimikrobial juga mengharapkan daya sitotoksitasnya rendah. Sementara Stock & Nehammer (1990) mengatakan bahwa dengan menggunakan dresing intrakanal yang mempunyai khasiat antimikroial yang kuat, tidak hanya membunuh bakteri tetapi juga dapat menimbulkan iritasi pada jaringan periapikal dan jaringan hidup sehat serta dapat menghambat proses penyembuhan.

Rowe (1967) mengatakan bahwa kalsium hidroksida dapat menyebabkan kerusakan jaringan periapikal dan menyebabkan nekrosis. Vajrabhaya (1997) mengatakan bahwa kalsium hidroksida jika keluar dari saluran akar akan dapat menimbulkan iritasi jaringan. Sampai saat ini masih ada yang berpendapat tentang kalsium hidroksida, misalnya Schawrtz (2001) yang mengatakan bahwa kalsium hidroksida sangat berbahaya jika keluar dari canalis alveolaris inferior akan menyebabkan neurotoksik.

Kalsium hidroksida telah dibuktikan efektivitasnya oleh sejumlah peneliti dan dikenal sangat popular dalam penggunaannya sebagai dresing intrakanal pada perawatan endodontik, karena mempunyai sifat antimikrobial yang tinggi dan mengandung pH yang sangat alkalis yakni 12,5. Laporan penelitian dari Freeman (1994) mengatakan bahwa kalsium hidroksida telah menunjukkan kemampuan dapat membentuk *calcified barrier* dentin reparatif pada jaringan pulpa dengan adanya ion kalsium (Ca^{2+}). Sifat ideal dresing intrakanal maupun bahan pengisi saluran akar harus suatu bahan yang biokompatibel dengan jaringan sekitarnya dan tidak toksik. Lai Chih (2003) menggunakan kalsium hidroksida sebagai dresing intrakanal memberikan hasil kesembuhan yang sangat baik pada perawatan gigi anjing dengan periodontitis apikalis.

Telah dilakukan penelitian uji sitotoksitas terhadap kultur sel jaringan fibroblas yang berasal dari *Baby Hamster Kidney* (BHK-21). *Cell lines* ini telah banyak digunakan untuk menguji toksisitas bahan dan obat-obatan di bidang kedokteran gigi.

Beberapa metode uji sitotoksitas misalnya *day exclusion test* yang cara penggunaannya secara manual dan konvensional dengan menghitung jumlah sel yang mati berdasarkan pada warna biru karena sel menyerap bahan *tryphan blue*. Pada penelitian ini digunakan metode yang akhir-akhir ini banyak digunakan untuk uji sitotoksitas suatu bahan yaitu uji enzimatik MTT ese [3-(4,5 *dimethylthiazol-2yl*)-2,5-*diphenyl tetrazolium bromide*]. Esei ini digunakan untuk mengukur proliferasi seluler secara kuantitatif atau untuk mengukur sel hidup. Penggunaan metode ini berdasarkan berbagai alasan antara lain hasil pengukuran akurat, sensitif karena

menggunakan Spektrofotometer yang dapat mendeteksi perubahan metabolisme sel secara jelas, manipulasi mudah, peralatan mudah didapat dan tersedia di laboratorium, penggunaan waktu dan tenaga yang cukup efisien, tidak menggunakan isotop radioaktif (Yuliati,2005).

Penelitian ini menggunakan kultur *cell line* karena dapat dilakukan pasase 50 – 70 kali, percepatan pertumbuhan sel tinggi, integritas sel tetap terjaga dan sel mampu bermultiplikasi dalam suspensi. Sel fibroblast merupakan sel yang dominan pada komponen pulpa , ligamen periodontal dan gingival.

Pengujian toksisitas pada penelitian ini menggunakan esei MTT. Dasar dari metode ini adalah menentukan kemampuan sel hidup untuk mereduksi garam MTT. Mekanismenya adalah garam *tetrazolium* berwarna kuning tersebut akan direduksi di dalam sel yang mempunyai aktifitas metabolik. Mitokondria dari sel hidup akan mengekskresi ensim dehidrogenase yang sangat berperan penting dalam proses ini. Bila mitokondria tidak aktif karena efek sitotoksik dari suatu bahan, maka metabolisme sel akan terganggu sehingga ensim dehidrogenase tidak dapat diekskresi yang mengakibatkan formazan tidak akan terbentuk. Jumlah formazan yang terbentuk, sebanding dengan aktifitas ensimatik sel hidup (Telli,1999; Yuliati,2005; Meizarini,2005).

Pada tabel 5.5 tentang hasil penelitian ini telah menunjukkan bahwa daya sitotoksitas kalsium hidroksida sebagai dresing intrakanal terhadap sel fibroblast BHK-21, pasta kalsium hidroksida dengan konsentrasi 50%, 55%, 60%, 65%, 70% tidak ada perbedaan yang bermakna. Hal ini berarti bahwa pada semua kelompok uji

kalsium hidroksida dengan berbagai konsentrasi tidak ada perbedaan dalam jumlah sel yang hidup atau tidak ada perbedaan toksisitas.

Pasta kalsium hidroksida dengan konsentrasi 60% menunjukkan optikal densitas sel hidup yang terdeteksi sebesar 0,77350 paling tinggi dibandingkan dengan kalsium hidroksida dengan konsentrasi yang lain. Pada konsentrasi tersebut jumlah sel hidup paling tinggi. Hal ini disebabkan oleh kalsium hidroksida konsentrasi 60% masih mampu menstimulasi sel sehingga kalsium hidroksida melepas ion kalsium yang tinggi yang mengakibatkan aktifitas ensim *alkalin phosphatase* (ALPase) meningkat sehingga menyebabkan proliferasi sel fibroblas (BHK-21) bertambah.

Hasil penelitian pada kalsium hidroksida dengan konsentrasi 65% dan 70% jumlah sel hidupnya menurun. Hal ini karena kalsium hidroksida telah mencapai titik jenuh terhadap kepekatananya sehingga sulit untuk melepas ion kalsium yang berakibat menurunnya aktivitas *alkalin phosphatase* (ALPase).

Beberapa peneliti *in vitro* kalsium hidroksida antara lain Rashid *et al* (2003) telah membuktikan bahwa dengan menambahkan CaCl_2 4mM pada sel pulpa manusia yang telah di kultur, menghasilkan peningkatan aktifitas *alkaline phosphatase* (ALPase) sehingga menyebabkan terjadinya poliferasi sel pulpa, namun dengan penambahan 0,7 mM terjadi penurunan aktifitas *alkaline phosphatase* (ALPase) di dalam sel pulpa yang menghasilkan penurunan jumlah sel pulpa. Sintesa kollagen dan aktifitas *alkalin phosphatase* meningkat dengan meningkatnya pH medium sampai 8. Kalsium hidroksida di dalam air akan terurai menjadi ion kalsium dan ion hidroksil. Ion kalsium adalah regulator penting untuk fungsi sel fibroblas. Ion kalsium yang terkandung di dalam kalsium hidroksida berperan penting di dalam klasifikasi sel.

Chang Chao (1998) mengatakan bahwa pasta kalsium hidroksida dapat membentuk *calcified barrier* pada ujung akar apikal yang dilakukan secara *in vivo*, sedang Hosoya (2001) mengatakan bahwa ion kalsium dapat memperbaiki sirkulasi pembuluh darah kapiler yang dapat menahan efek pada eksudasi jaringan.

BAB.7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

1. Kalsium hidroksida dengan konsentrasi 60% menunjukkan daya antimikrobial yang paling tinggi dibanding konsentrasi yang lain.
2. Kalsium hidroksida dengan konsentrasi 60% menunjukkan toksisitas paling rendah dibanding konsentrasi yang lain.
3. Kalsium hidroksida dengan konsentrasi 60% mempunyai daya antimikrobial yang optimal dengan toksisitas yang rendah.

7.2 SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kemampuan daya antimikrobial terhadap bakteri *S. viridans* dan daya sitotoksitas pasta kalsium hidroksida dengan konsentrasi 60% pada binatang coba.

DAFTAR PUSTAKA

- Anussavic KJ, 2003. Science of dental materials.11st ed, Elsevier Science (USA) Saunder, p.172 – 194.
- Aravena N.A, 1993. Identification of Streptococcus, Europe J of clinical Microbiology.12 (2):21 – 23.
- Barbosa CAM, Goncalves RB, 1997. Evaluation of Antibacterial Activities of Calcium Hydroxide, Chlorhexidine, and Camphorated Paramonochlorophenol as Intracanal Medicament. Clinical and laboratorium Study. J.Endod 23 (5):297 – 299.
- Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM, 1994. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology 9 th.Ed. CV Mosby. Toronto.p.342-345.
- Brooks GF, Butel JS, and Morse SA, 2001. Mikrobiologi Kedokteran . Penerjemah dan editor. Mudihardi,E. Kuntaman, Wasito,EB, Mertaniasih.NM. Harsono,S. Alimsardjono,L, Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Penerbit Salemba. hal. 223-235.
- Cohen S and Burn RC, 1994 Pathways of the pulp, 6 st ed,St. Louis,Mosby.p. 211 – 212, 486 – 507.
- Chang Chao Y. Huang Fue M, Cheng HM, 1998. In Vitro Evaluation of the Cytotoxicity and Genotoxicity of Root Canal Medicine on Human Pulp Fibroblasts. J.Endod.24 (9) : 604-606.
- Dash,P.Standard protocols MTT assay (kutipan dari Yuliati,A. MKG.2004) Avalaible from : <http://web.bham.ac.uk/can4psd4/brum/mtt.html>. Accessed : 8/1/2002.
- Di Fiore PM, Peter D, Setterstrom JA, 1983. The antibacterial Effects of Calcium hydroxide apexification pastas on Streptococcus sanguis.J.Oral Surg.55 (1) : 91-93.
- Estrela C, Pimenta FC, Ito Yoko I, Bammann L, 1998. In Vitro Determination of Direct Antimicrobial Effect of Calcium Hydroxide. J.Endod. 24 (1) : 15-17.
- Estrela C, 2003. Calcium Hydroxide : Study based on Scientific Evidences. J.Appt Oral Sci. 11(4):269-282.
- Fernandes – Botran R and Vetviaeka V, 1995. Methode in cellular immunology.CRC Press. Boca raton, New York, London,Tokyo: 47-52.Freshney IR, 1987 Culture of animal cells, 2 nd ed. New York : Alan R Liss Inc.p. 227 – 245.

- Freeman Kun, 1994. Continuosly Infused Calcium Hydroxide its influence on Hard Tissue Repair. *J.Endod.* 20 (6) : 272 – 274.
- Ganiswarna SG, 1997. Farmakologi dan Terapi ed.4. Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas indonesia. Penerbit, Gaya Baru, Jakarta..hal. 571-583.
- Ganong WF, 2001. Buku Ajar Fisiologi Kedokteran (Review of Medical Physiology) ed.20. Penerbit Buku Kedokteran EGC. hal. 38-39.
- Gomes BP, Ferraz CC, Garrido FD, 2003. Microbial Susceptibility to Calcium Hydroxide Pastes and Their Vehicle. *J.Endod.* 29 (11) : 758-761.
- Geurtzen W, Leyhausen G, 1997. Biological aspect of root canal filling materials histocompatibility, cytotoxicity, and mutagenicity. *J.Clin. Oral.Invest.*, 1:5-11.
- Grossman LI, Oliet S, Del Rio CE, 1995. Ilmu Endodontik Dalam praktek; alih Bahasa: Abyono.R. Cetakan I. Penerbit Buku kedokteran. EGC, Jakarta: 248 – 250, 256.
- Hosoya N, Takahashi G, Arai T and Nakamura J. 2001. Calcium Concentration and pH of Periapical Environment after Applying Calcium Hydroxyde into Root Canals In Vitro. *J.Endod.* 27 (5): 343-346.
- Jaklik W.L, 1984. Zinnser Microbiology, 18 th ed. Appleton – Century, Crafts, Connecticut. hal.234-249.
- Katzung BG, 2001. Basic and Pharmacology. 8 th ed. San Fransisco : Mc Grow-Hill comp inc. Editoor oleh Dripa Sjahbana. Farmakologi Dasar dan klinik. Jakarta: Salemba Medika. hal. 3-16.
- Lambrianidis T, Margelos J and Beltes P, 1999. Removal Efficiency of Calcium Hydroxide Dressing from the Root Canal. *J.Endod.* 25 (2) ; 85-88
- Lai Chih C, Huang FM, Chan Y, Chang ChaoY, 2003. Antibacterial Effects of Resinous Retrograde Root Filling Materials. *J.Endod.* 29 (2) : 118-120.
- Leonardo MR, Sielveira FF, 2002. Calcium Hydroxyde Root Canal Dressing. Histopathological Evaluation of Perapical repair at Different Time Periods.*J.Braz Dent.* 13:17-22.
- Levebvre CA, Schuster GS, 1994. Biocompatibility of visible light cure resin system in Prosthodontics. *J.Prosthet Dent.* 2 : 178 –185.
- Maat S, 1999. kultur jaringan, catatan Kuliah, Program Pasca sarjana Universitas Airlangga.hal. 1-3,14 –15, 60-63.

- Meizarini A, 2005. Sitotoksitas bahan restorasi cyanocrylate pada variasi perbandingan powder dan liquid menggunakan MTT assay. Majalah Kedokteran Gigi. 38 (1) :20-24.
- Macaci F, Araki K and Suda H, 1998. Effect of Calcium Hydroxide on the Dissolution of Soft Tissue on the Root Canal Wall. J.Endod. 24 (5): 326 –329.
- Meizarini A, 2005. Sitotoksitas bahan restorasi cyanocrylate pada variasi perbandingan powder dan liquid menggunakan MTT assay. Majalah Kedokteran Gigi. 38 (1) :20-24.
- Mickel KA, Nguyen TH, Chogle S, 2003. Antimicrobial Activity of Endodontic Sealers on Enterococcus faecalis. J.Endod. 29 (4) : 257-258.
- Morrier JJ, Benay G, Hortman C, 2003 : Antimikrobal Activity of Calcium Hydroxide Dental Cements. An In Vitro Study. J.Endod. 29 (1) : 51-53.
- Oztan MD, Yilmaz S, Kalayci A & Zaimoglu L, 2003. A Comparison of the in vitro cytotoxicity of two root canal sealer. J. of Oral Rehab. 30. 426-429.
- Pitt Ford TR, 1997. Endodontic in Clinical Practice. UnitedMedical and Dental Schools, University of London, UK.hal. 108 –109.
- Rashid F, Shiba H, Mizuno N, 2003. The Effect of Extracellular Calcium Ion on Gene Expression of Bone related Protein in Human Pulp Cells. J.Endod. 29 (2) : 104-105.
- Rowe (dikutip dari Weinstein) 1977. Apical hard tissue deposition in adult teeth of Monkey with use of Calcium hydroxide. J.Oral Surg.43 (4) :627-629.
- Siti Mardewi SM, 2000. Perkembangan Endodontologi dari masa ke masa, Seminar sehari tema Ramah perlakuan pada jaringan gigi. IKORGI.hal. 6-7, di Hotel Equator Surabaya.
- Safavi K and Nakayama TA, 2000. Influence of mixing vehicle on dissociation of Calcium Hydroxide in solution, J.Endod, 26:649-652.
- Saifuddin I, 1986. Khasiat dan Efek Iritasi Antiseptik Poliantibiotika dengan Metronodazol sebagai obat Sterilisasi Saluran Akar, penelitian Laboratorium, Surabaya.hal. 13-14.
- Schawrtz R, Gary, Dreyer M, Aydin M, 2001. The opinion within this web page are not our. Authors have been credited for the individual posts where they are. www.rxroots.com-X-Rays courtesy. Dental India Home page. Accessed : 23/5/2005

- Siqueira JF and Uzeda M, 1997. Intracanal Medicaments: Evaluation of the Antibacterial Effect of Chlorhexidine, Metronidazole and Calcium Hydroxide Associate with three vehicle. *J.Endod.*23 (3): 167-169.
- Siqueira JF and Lopes HP, 1999. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide : a critical review. *J.Intern. Endod.* 32: 361 –369.
- Siqueira JF, Uzeda M, 1998. Influence of Different Vehicle on the Antibacterial Effect of Calcium Hydroxide. *J Endod.* 24 (10): 663
- Siregar F, Hadijono BS, 2000. Uji sitotoksitas dengan esei MTT. *Journal Kedokteran Gigi Universitas Indonesia*, 7 (Edisi khusus) : 28-32.
- Sjogren U, Fidgor D, Spangberg L, Sundqvist G, 1991. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short – term intracanal dressing. *Int. J.Endod.*24 (1)19-25.
- Solak H, Oztan M D, 2003. The pH change of four different calcium hydroxide mixture used for intracanal medication. *J.Oral Rehab.*30:436-439.
- Sommer RF, Ostrander FD and Crowley MC, 1996. Clinical Endodontics,2 nd Ed. Philadelphia,W.B.Saunders Company. p.73-74.
- Stock CJR and Nehammer CF, 1990. Endodontic in Practice : The Modern concept of endodontic. British Dental Association, second ed. London .p. 1-10,23-27.
- Spangberg L, 1969. Biologic Effect In Vitro of Water Soluble Components of Root Canal Filling Material on HeLa Cell. *J.Odontol, Revy* 20 (1) : 69-72.
- Suzuki K, Higuchi N, Horiba N, Matsumoto T and Nakamura H, 1999. Antimicrobial effect of calcium hydroxide on bacteria isolated from infected root canals. *J.Conservative Dentistry. Dentistry in Japan.* 35: 43 –47.
- Telli C, Serper A, Dogan L, Gug D, 1999.Evaluation of the Cytotoxicity of Calcium Phosphate Root Canal Sealer by MTT assay. *J.Endod.* 25 (12) : 811 – 813.
- Tronstad L, Andreasen JO, Hasselgren G, Kristerson L, Riis I, 1981. pH change in dental tissue alter root canal filling with calcium hydroxide. *J.Endod.*7: 17.
- Tziafas D, Economides N, 1999. Formation of crystals on the surface of calcium hydroxide – containing materials in Vitro. *J.Endod.*23 (8): 539.
- Vajrabhaya L, Sithisam P, Wilairat P dan Leelaphiwat S, 1997. Comparison between Sulphorhodamine – B Dye Sstaiining and 51 Release Method in Cytotoxicity Assay of Endodontic Sealers. *J. Endod.*23 (6) : 355 -357

- Wayman BE, Murata SM, Almeida RJ, Fowler CB, 1992. A bacteriological and histological evaluation of 58 periapical lesion. J.Endod; 18: 152 -5.
- Walton dan Torabinej, 1998. Pembersihan dan pembentukan saluran akar. Dalam Prinsip dan praktek ilmu endodontik, alih bahasa oleh Narlan Sumawinata, Bambang Nursasongko, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta..hal. 295 – 298.
- Watts A, 1990. Detection of bacteria in histological section of the dental pulp, Int Dent J, 23:14 – 17
- Widodo T, 2000. Paradigma baru pada perawatan endodontik. Kumpulan naskah seminar sehari tema ramah perlakuan pada jaringan gigi, IKORGI. hal.2,6-7.
- Wistreich GA, Lechtman MD, 1980. Laboratory Exercises in Microbiology. Antibiotic Sensitivity Testing Method. Third edition, Glencoe Publishing Co.,Inc, London.p. 234 -237.
- Yuliati A, 2004. Uji toksisitas resin komposit sinar tampak pada kultur sel dengan eseai MTT. Majalah Kedokteran Gigi. Dental journal. 37 (2): 83-86.
- Yuliati A, 2005. Viabilitas sel fibroblas BHK-21 pada permukaan resin akrilik rapid heat cured. Majalah Kedokteran Gigi . Dental Journal. 38 (2) : 68-71.

Lampiran 1.

Data hasil pengukuran diameter zona hambatan kalsium hidroksida terhadap bakteri *Streptococcus viridans* dengan uji Antimikrobial (mm).

Nomer	50%	55%	60%	65%	70%
1	15	14	16	15	13
2	14	16	14	14	10
3	14	14	15	12	13
4	15	14	19	12	11
5	17	18	15	14	11
6	15	16	16	13	12
7	13	14	16	12	10
8	14	13	15	13	11

Lampiran 2.

Data hasil pengukuran jumlah sel hidup dengan Spektrofotometer 595nm pada uji Sitotoksitas kalsium hidroksida terhadap sel fibroblas (BHK-21) (OD).

No.	50%	55%	60%	65%	70%
1	0,676	0,578	0,713	0,661	0,748
2	0,592	0,788	0,793	0,841	0,761
3	0,791	0,793	0,749	0,780	0,776
4	0,774	0,739	0,710	0,792	0,741
5	0,746	0,766	0,982	0,680	0,689
6	0,772	0,908	0,696	0,830	0,777
7	0,622	0,708	0,772	0,709	0,759
8	0,667	0,711	0,773	0,819	0,675

Lampiran 3. Hasil analisa statistik ANOVA satu arah pada uji Antimikrobial kalsium hidroksida terhadap bakteri *Streptococcus viridans*.

Oneway ANOVA - Uji Mikrobial

Descriptives

Uji Mikrobial

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
50%	8	14,6250	1,1877	,4199	13,6320	15,6180	13,00	17,00
55%	8	14,8750	1,6421	,5806	13,5022	16,2478	13,00	18,00
60%	8	15,7500	1,4880	,5261	14,5060	16,9940	14,00	19,00
65%	8	13,1250	1,1260	,3981	12,1836	14,0664	12,00	15,00
70%	8	11,3750	1,1877	,4199	10,3820	12,3680	10,00	13,00
Total	40	13,9500	2,0121	,3181	13,3065	14,5935	10,00	19,00

Test of Homogeneity of Variances

Uji Mikrobial

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,488	4	35	,745

ANOVA

Uji Mikrobial

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	94,900	4	23,725	13,181	,000
Within Groups	63,000	35	1,800		
Total	157,900	39			

Lampiran 4. Hasil uji LSD zona hambatan kalsium hidroksida dengan berbagai konsentrasi terhadap *Streptococcus viridans*.

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Uji Mikrobial
LSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
50%	55%	-.2500	,6708	,712	-1,6118	1,1118
	60%	-1,1250	,6708	,102	-2,4868	,2368
	65%	1,5000*	,6708	,032	,1382	2,8618
	70%	3,2500*	,6708	,000	1,8882	4,6118
55%	50%	,2500	,6708	,712	-1,1118	1,6118
	60%	-,8750	,6708	,201	-2,2368	,4868
	65%	1,7500*	,6708	,013	,3882	3,1118
	70%	3,5000*	,6708	,000	2,1382	4,8618
60%	50%	1,1250	,6708	,102	-2,368	2,4868
	55%	,8750	,6708	,201	-4868	2,2368
	65%	2,6250*	,6708	,000	1,2632	3,9868
	70%	4,3750*	,6708	,000	3,0132	5,7368
65%	50%	-1,5000*	,6708	,032	-2,8618	-,1382
	55%	-1,7500*	,6708	,013	-3,1118	-,3882
	60%	-2,6250*	,6708	,000	-3,9868	-1,2632
	70%	1,7500*	,6708	,013	,3882	3,1118
70%	50%	-3,2500*	,6708	,000	-4,6118	-1,8882
	55%	-3,5000*	,6708	,000	-4,8618	-2,1382
	60%	-4,3750*	,6708	,000	-5,7368	-3,0132
	65%	-1,7500*	,6708	,013	-3,1118	-,3882

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 5. Uji Distribusi normal – uji Antimikrobal 50%, 55%, 60%.

Uji Distribusi Normal - Uji mikrobial 50%

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Uji Mikrobial
N		8
Normal Parameters a,b	Mean	14,6250
	Std. Deviation	1,1877
Most Extreme Differences	Absolute	,251
	Positive	,251
	Negative	-,174
Kolmogorov-Smirnov Z		,710
Asymp. Sig. (2-tailed)		,694

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Uji Distribusi Normal - Uji Mikrobial 55%

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Uji Mikrobial
N		8
Normal Parameters a,b	Mean	14,8750
	Std. Deviation	1,6421
Most Extreme Differences	Absolute	,328
	Positive	,328
	Negative	-,172
Kolmogorov-Smirnov Z		,928
Asymp. Sig. (2-tailed)		,356

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Uji Distribusi Normal - Uji Mikrobial 60%

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Uji Mikrobial
N		8
Normal Parameters a,b	Mean	15,7500
	Std. Deviation	1,4880
Most Extreme Differences	Absolute	,308
	Positive	,308
	Negative	-,182
Kolmogorov-Smirnov Z		,872
Asymp. Sig. (2-tailed)		,433

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Lampiran 6. Uji Distribusi Normal – uji Antimikrobal 65%, 70%.

Uji Distribusi Normal - Uji Mikrobal 65%

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Uji Mikrobal
N		8
Normal Parameters a,b	Mean	13,1250
	Std. Deviation	1,1260
Most Extreme Differences	Absolute	,216
	Positive	,216
	Negative	-,159
Kolmogorov-Smirnov Z		,611
Asymp. Sig. (2-tailed)		,849

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Uji Distribusi Normal - Uji Mikrobal 70%

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Uji Mikrobal
N		8
Normal Parameters a,b	Mean	11,3750
	Std. Deviation	1,1877
Most Extreme Differences	Absolute	,249
	Positive	,249
	Negative	-,164
Kolmogorov-Smirnov Z		,704
Asymp. Sig. (2-tailed)		,705

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Lampiran 7. Hasil analisa statisktik ANOVA satu arah pada uji sitotoksitas kalsium hidroksida dengan berbagai konsentrasi terhadap sel fibroblas (BHK-21).

Oneway

Descriptives

Uji Toksisitas

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
50%	8	,70500	7,5848E-02	2,68E-02	,64159	,76841	,592	,791
55%	8	,75638	9,2657E-02	3,28E-02	,67891	,83384	,578	,908
60%	8	,77350	9,1147E-02	3,22E-02	,69730	,84970	,696	,982
65%	8	,76400	7,0751E-02	2,50E-02	,70485	,82315	,661	,841
70%	8	,74075	3,8459E-02	1,36E-02	,70860	,77290	,675	,777
Total	40	,74792	7,6282E-02	1,21E-02	,72353	,77232	,578	,982

Test of Homogeneity of Variances

Uji Toksisitas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,762	4	35	,557

ANOVA

Uji Toksisitas

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2,302E-02	4	5,756E-03	,988	,427
Within Groups	,204	35	5,826E-03		
Total	,227	39			

Lampiran 8

**HASIL PENELITIAN PENDAHULUAN DIAMETER ZONA
HAMBATAN KALSIUM HIDROKSIDA TERHADAP *S.VIRIDANS* YANG
DILAKUKAN DI LABORATORIUM MIKROBIOLOGI KLINIK
FAKULTAS KEDOKTERAN UNAIR - RSUD DR.SOETOMO
SURABAYA.**

TANGGAL : 30 DESEMBER 2004 – 22 FEBRUARI 2005

Konsentrasi	Zone Hambatan				
	Strep.Vi I	II	III	IV	V
50 %	14	14	14	13	14
55 %	14	14	14	13	14
60 %	16	13	13	12	16
65 %	15	13	12	12	15
70 %	14	13	13	12	14