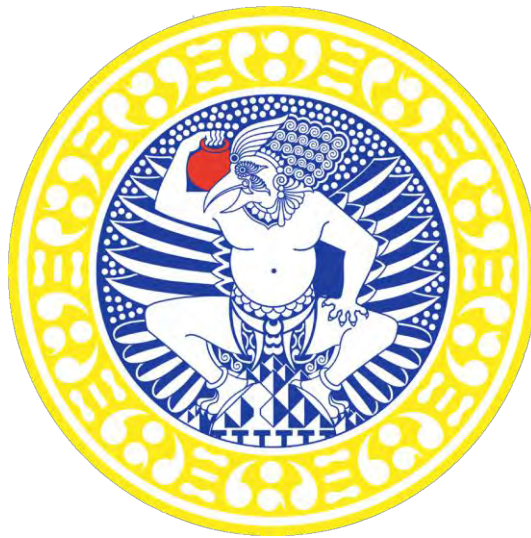


**HAMBATAN PEMBENTUKAN BIOFILM *Lactobacillus acidophilus* AKIBAT PAPARAN KOMBINASI KALSIMUM HIDROKSIDA-PROPOLIS**

**SKRIPSI**



**Oleh:**

**DIDA DEVINA**  
**021511133043**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI**  
**UNIVERSITAS AIRLANGGA**  
**SURABAYA**  
**2018**

LEMBAR PENGESAHAN

**HAMBATAN PEMBENTUKAN BIOFILM *Lactobacillus acidophilus* AKIBAT PAPARAN KOMBINASI KALSIUM HIDROKSIDA-PROPOLIS**

**SKRIPSI**

Disusun Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Menyelesaikan Pendidikan Sarjana Kedokteran Gigi Di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya

Oleh:

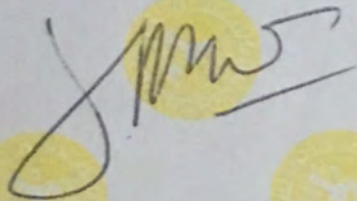
**DIDA DEVINA**

**021511133043**

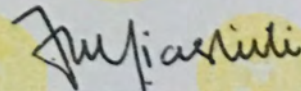
Menyetujui,

**Pembimbing Utama**

**Pembimbing Serta**



**Nirawati Pribadi, drg., M.Kes., Sp.KG(K)**  
**NIP.196309151990022001**



**Dr. Ira Widjiastuti, drg., M.Kes., Sp.KG(K)**  
**NIP : 196305141988032002**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**2018**

## **PENETAPAN PANITIA PENGUJI SKRIPSI**

Skripsi ini telah diuji pada tanggal 25 Oktober 2018

### **PANITIA PENGUJI SKRIPSI**

1. Nirawati Pribadi, drg., M.Kes., Sp.KG(K) (Pembimbing Utama)
2. Dr. Ira Widjiastuti, drg., M.Kes., Sp.KG(K) (Pembimbing Serta)
3. Devi Eka Yuniarti, drg., M.Kes., Sp.KG(K) (Penguji)
4. Ari Subiyanto, drg., MS., Sp.KG(K) (Penguji)
5. Dr. Sukaton, drg., M.Kes., Sp.KG(K) (Ketua Penguji)



## SURAT PERNYATAAN TENTANG ORISINALITAS

Yang bertanda tangan di bawah ini, saya:

Nama : Dida Devina  
NIM : 021511133043  
Program Studi : Pendidikan Dokter Gigi  
Fakultas : Kedokteran Gigi  
Jenjang : Sarjana (S1)

Menyatakan bahwa saya tidak melakukan plagiat dalam penulisan skripsi saya yang berjudul:

### HAMBATAN PEMBENTUKAN BIOFILM *Lactobacillus acidophilus* AKIBAT PAPARAN KOMBINASI KALSIMUM HIDROKSIDA-PROPOLIS

Apabila suatu saat nanti terbukti melakukan tindakan plagiat, maka saya akan menerima sanksi yang telah ditetapkan.

Demikian surat pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya, 20 Oktober 2018



Dida Devina  
NIM. 021511133043

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur pada Tuhan YME karena hikmat dan penyertaan-Nya sehingga saya dapat menyelesaikan pembuatan skripsi dengan judul “Hambatan Pembentukan Biofilm *Lactobacillus acidophilus* akibat Paparan Kombinasi Kalsium Hidroksida-Propolis”.

Pembuatan skripsi merupakan kewajiban bagi mahasiswa/i jenjang Strata 1 Program Studi Pendidikan Dokter Gigi sekaligus sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan Pendidikan Dokter Gigi di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga. Skripsi ini tidak lepas dari bantuan, dukungan, dan bimbingan berbagai pihak. Pada kesempatan ini saya mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. R. Darmawan Setijanto, drg., M.Kes., Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan menempuh pendidikan di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.
2. Dr. Ira Widjiastuti, drg., M.Kes., Sp.KG(K), selaku Ketua Departemen Konservasi Gigi yang telah memberikan izin dalam pembuatan skripsi.
3. Nirawati Pribadi, drg., M.Kes., Sp.KG(K), Pembimbing Utama yang telah memberikan ijin dalam pembuatan skripsi dan telah meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan, arahan, kritik, dan saran kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi.
4. Dr. Ira Widjiastuti, drg., M.Kes., Sp.KG(K), Pembimbing Serta yang telah meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan, arahan, kritik, dan saran kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi.
5. Devi Eka Yuniarti, drg., M.Kes., Sp.KG(K), Ari Subiyanto, drg., MS., Sp.KG(K), dan Dr. Sukaton, drg., M.Kes., Sp.KG(K) selaku dosen penguji

yang telah memberikan saran dan kritik yang membangun untuk perbaikan skripsi ini.

6. Kedua orang tua (Ir. Yoyok Sudiprapcahyo, MM dan Pratiti Wiwietiany S, S.H), kakak Dio Devara, S.M, adik Dandy Devandi, serta keluarga besar yang selalu memberikan dukungan, motivasi, terlebih doa sehingga saya dapat menyelesaikan skripsi ini.
7. Vita, Nancy, Vida, Dini, Ully, Victor, Hansen, serta teman-teman saya yang telah membantu dan mendukung penulisan skripsi saya.
8. Mas Slamet selaku laboran yang telah membantu selama penelitian di Universitas Brawijaya Malang, serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis menerima saran dan kritik yang membangun dari pada pembaca demi perbaikan di kemudian hari. Semoga skripsi ini bermanfaat bagi masyarakat pada umumnya dan dokter gigi pada khususnya.

Surabaya, Oktober 2018

Penulis

*INHIBITION EFFECT OF COMBINATION OF CALCIUM  
HYDROXIDE-PROPOLIS EXPOSURE AGAINST THE  
BIOFILM FORMATION OF *Lactobacillus acidophilus**

**ABSTRACT**

**Background:** Calcium hydroxide is a material used as pulp capping material. From Satriya's (2016) research 540 cases of direct pulp capping with calcium hydroxide, only 201 cases (37.2%) that categorized as successful. The weakness of calcium hydroxide may causes many researchers to look for alternative materials, mainly by adding materials derived from nature. Propolis has long been used because of its ability as anti-inflammatory, anti microbial, etc. The addition of propolis extract to the calcium hydroxide is expected to improve the function of calcium hydroxide. **Purpose:** To know the inhibition effect of combination of calcium hydroxide-propolis exposure against the biofilm formation of *Lactobacillus acidophilus*. **Methods:** This research use 2 treatment groups with each consisting of 8 replications. Group 1 is a combination of calcium hydroxide-propolis ratio 1:2 and control group is *Lactobacillus acidophilus*. Add the combination to well-microtitter plate that contain *Lactobacillus acidophilus* suspension, grown for 24 hours, washed with PBS. Add Crystal Violet, grown for 15 minutes, rinse with PBS and grown for 24 hours. Add isopropanol in each well and put in ELISA Reader to measure its Optical Density. **Result:** In the OD reading results obtained the sample OD value is smaller than the control group, which is 41.45% compared to 100%, which means the combination of calcium hydroxide-propolis with a ratio of 1: 2 can inhibit the growth of *Lactobacillus acidophilus* biofilm with only 41.45% of the biofilm material left. **Conclusion:** The combination of calcium hydroxide-propolis exposure is able to inhibit the biofilm formation of *Lactobacillus acidophilus*.

**Key words:** *Combination of Calcium Hydroxide-Propolis; Lactobacillus acidophilus; Biofilm*

HAMBATAN PEMBENTUKAN BIOFILM *Lactobacillus acidophilus* AKIBAT PAPARAN KOMBINASI KALSIUM HIDROKSIDA-PROPOLIS

**ABSTRAK**

**Latar belakang:** Kalsium hidroksida adalah material yang digunakan sebagai bahan *pulp capping*. Menurut penelitian Satriya (2016) dari penatalaksanaan 540 kasus *direct pulp capping* dengan kalsium hidroksida, hanya 201 kasus (37,2%) yang dikategorikan berhasil. Kelemahan dari kalsium hidroksida menyebabkan banyak peneliti mencari material alternatif, terutama yang berasal dari alam. Propolis dalam kedokteran gigi telah lama digunakan karena kemampuannya sebagai anti inflamasi, anti mikroba, anti jamur, dan dapat menyembuhkan luka. Penambahan ekstrak propolis pada kalsium hidroksida ini diharapkan dapat meningkatkan fungsi dari kalsium hidroksida. **Tujuan:** Mengetahui pengaruh paparan kombinasi kalsium hidroksida-propolis terhadap hambatan pembentukan biofilm *Lactobacillus acidophilus*. **Metode:** Penelitian ini menggunakan 2 kelompok perlakuan dengan masing-masing kelompok 3 replikasi. Grup 1 adalah kombinasi kalsium hidroksida-propolis dengan perbandingan 1:2 dan kelompok kontrol negatif adalah *Lactobacillus acidophilus*. Ditambahkan kombinasi kalsium hidroksida-propolis ke *well microtiter plate* yang sudah berisi suspensi *Lactobacillus acidophilus*, diinkubasi 24 jam, lalu cuci dengan PBS. Lalu tambahkan *Crystal Violet*, inkubasi 15 menit, cuci dengan PBS dan inkubasikan kembali 24 jam. Tambahkan *isopropanol* pada setiap *well* dan baca dengan *ELISA Reader* untuk mengukur *Optical Density*. **Hasil:** Pada hasil pembacaan nilai OD, didapatkan nilai OD pada kelompok perlakuan lebih kecil daripada kelompok kontrol, yaitu 41,45% dibanding 100%, yang menandakan bahwa kombinasi kalsium hidroksida-propolis dengan perbandingan 1:2 dapat menghambat pembentukan dari biofilm *Lactobacillus acidophilus* dengan hanya menyisakan 41,45% pada *well*. **Kesimpulan:** Kombinasi kalsium hidroksida-propolis dapat menghambat pembentukan biofilm *Lactobacillus acidophilus*.

**Kata Kunci:** Kombinasi kalsium hidroksida-propolis, *Lactobacillus acidophilus*, biofilm



## DAFTAR ISI

<b>SAMPUL DEPAN</b> .....	
<b>LEMBAR PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>PENETAPAN PANITIA PENGUJI SKRIPSI</b> .....	iii
<b>SURAT PERNYATAAN TENTANG ORISINALITAS</b> .....	iv
<b>UCAPAN TERIMA KASIH</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>ABSTRAK</b> .....	viii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	viii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xiii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xiv
 <b>BAB 1 PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang Masalah .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	6
1.3 Tujuan.....	6
1.3.1 Tujuan Umum.....	6
1.3.2 Tujuan Khusus.....	7
1.4 Manfaat Penelitian.....	7
1.4.1 Manfaat Teoritis .....	7
1.4.2 Manfaat Praktis.....	7
 <b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	8
2.1.1 Struktur sel <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	8

2.1.2	Metabolisme <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	10
2.2	Biofilm .....	12
2.2.1	Definisi Biofilm .....	12
2.2.2	Struktur Biofilm .....	12
2.2.3	Tahapan Pembentukan Biofilm .....	13
2.2.4	Patogenitas Biofilm .....	15
2.3	Kalsium Hidroksida .....	16
2.4	Propolis .....	17
2.5	Kombinasi Kalsium Hidroksida-Propolis .....	18
 <b>BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b>		
3.1	Kerangka Konseptual .....	20
3.2	Keterangan Kerangka Konseptual .....	21
3.3	Hipotesis Penelitian .....	22
 <b>BAB 4 METODE PENELITIAN</b>		
4.1	Penelitian .....	23
4.2	Sampel Penelitian dan Besar Sampel .....	23
4.2.1	Sampel Penelitian .....	23
4.2.2	Besar Sampel .....	23
4.3	Variabel Penelitian .....	24
4.3.1	Variabel Bebas .....	24
4.3.2	Variabel Terikat .....	24
4.3.3	Variabel Terkendali .....	24
4.4	Definisi Operasional .....	24
4.5	Lokasi dan Waktu Penelitian .....	25

4.5.1 Lokasi Penelitian .....	25
4.5.2 Waktu Penelitian .....	25
4.6 Alat dan Bahan .....	25
4.6.1 Alat .....	25
4.6.2 Bahan .....	26
4.7 Prosedur Penelitian .....	27
4.7.1 Sterilisasi Alat dan Bahan .....	27
4.7.2 Pembuatan Ekstrak Propolis .....	27
4.7.3 Pembuatan Sampel Kombinasi Kalsium Hidroksida-Propolis ....	27
4.7.4 Persiapan Bakteri <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	28
4.7.5 Pemberian Kombinasi Kalsium Hidroksida-Propolis pada Biofilm <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	28
4.7.6 Pewarnaan Biofilm <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	29
4.7.7 Pengamatan Daya Hambat Pembentukan Biofilm .....	29
4.8 Penghitungan dan Analisis Data .....	29
4.9 Alur Penelitian .....	31
<b>BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA</b>	
5.1 Hasil Penelitian .....	32
5.2 Analisa Statistik .....	33
<b>BAB 6 PEMBAHASAN</b>	
<b>BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
7.1 Kesimpulan .....	40
7.2 Saran .....	40
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	41

**LAMPIRAN** ..... 47

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.1 Struktur dinding sel dari <i>L.acidophilus</i> .....	9
Gambar 2.2.1 Tahap pembentukan biofilm .....	15
Gambar 5.1 <i>Microtitter plate</i> yang sudah dilakukan uji hambat pembentukan biofilm dan akan dibaca nilai OD-nya dengan <i>ELISA Reader</i> .....	32



## DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Nilai rerata dan standar deviasi dari hasil <i>Optical Density</i> .....	33
Tabel 5.2 Hasil uji normalitas <i>One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test</i> .....	33
Tabel 5.3 Hasil uji beda rerata <i>Independent Samples T-Test</i> .....	33

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Keterangan Laik Etik

Lampiran 2. Analisis Fitokimia Kalsium Hidroksida

Lampiran 3. Analisis Fitokimia Propolis

Lampiran 4. Analisis Fitokimia Kombinasi Kalsium Hidroksida-Propolis 1:2

Lampiran 5. Hasil Penelitian

Lampiran 6. Hasil Analisis Data

# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Masalah

Di Indonesia, sebesar 25,9% penduduk mempunyai masalah gigi dan mulut. Penyakit gigi dan mulut ini berada pada peringkat tertinggi ke-6 dari berbagai macam penyakit yang dikeluhkan masyarakat Indonesia. Salah satu dari penyakit yang sering dikeluhkan masyarakat adalah karies (Riskesdas, 2013). Karies merupakan salah satu penyakit infeksi multifaktorial yang sering terjadi di seluruh dunia (Cura *et al.*, 2012). Proses demineralisasi pada enamel adalah penyebab utama karies. Hasil kumulatif dari demineralisasi dan remineralisasi tersebut akan menyebabkan kerusakan terhadap jaringan keras gigi (Kidd, 2004). Karies terjadi karena adanya interaksi gigi dan saliva sebagai *host*, bakteri normal di dalam mulut serta makanan yang dikonsumsi terutama makanan yang mengandung karbohidrat yang dapat dengan mudah menjadi asam melalui glikolisis pada fermentasi dengan peran *Lactobacillus acidophilus* (Suryadinata, 2012).

Di antara beragam spesies *Lactobacillus sp.* yang telah teridentifikasi, *Lactobacillus acidophilus* adalah spesies paling banyak ditemukan pada saliva penderita karies (Badet dan Thebaud, 2008). *L. acidophilus* bersama *S. mutans* memproduksi asam laktat dari gula yang dapat difermentasi dan mampu bertahan hidup dalam kondisi lingkungan yang asam (Mei, 2013). Bakteri ini menempel pada permukaan gigi untuk memetabolisme karbohidrat dan memproduksi asam organik yang menyebabkan terjadinya penurunan pH mulut secara drastis sehingga menghasilkan demineralisasi enamel gigi (Cura *et al.*, 2012).

Sementara biofilm dapat didefinisikan sebagai kelompok mikroorganisme terorganisir yang hidup dalam matriks polimer yang diproduksi sendiri melekat pada beberapa permukaan (Hurlow *et al.*, 2015). Biofilm memungkinkan mikroba untuk membentuk komunitas, melekat erat pada permukaan, menghindari kekebalan pejamu, serta melawan antibiotik. Mikroorganisme patogen yang membentuk biofilm sulit untuk diatasi (Allewell, 2016). Biofilm dapat merupakan agregat mikroba sejenis maupun berbeda jenis. Biofilm ini mampu melekat pada permukaan substrat biologis maupun non biologis di mana terdapat ikatan dan melekat satu sel dengan sel lainnya pada substrat dengan perantara *Extracellular Polymeric Substance* (EPS) (Hall-Stoodley, 2004). Pembentukan dan perkembangan biofilm dipengaruhi oleh berbagai faktor, termasuk strain bakteri, kondisi permukaan, dan parameter lingkungan seperti pH, konsentrasi nutrisi, dan suhu. Pembentukan ini terdiri dari 5 tahap. Tahap yang pertama adalah (i) *initial attachment* atau perlekatan sel di mana kekuatannya bergantung pada sifat fisikokimia dari permukaan sel bakteri. Perlekatan ini bersifat *reversible* karena mikroorganisme yang melekat belum menuju ke proses diferensiasi yang memerlukan perubahan morfologis berseri yang mengarah pada pembentukan biofilm. Tahap kedua adalah (ii) *irreversible attachment*. Perubahan ini melibatkan pergeseran dari interaksi bakteri yang lemah dengan permukaan menjadi ikatan permanen dengan kehadiran EPS. Selanjutnya yaitu tahap ketiga (iii) *microcolony formation*. Ditandai dengan agregasi sel menjadi mikrokoloni yang menghasilkan akumulasi dan pertumbuhan dari mikroorganisme yang merupakan awal dari terbentuknya EPS. EPS membantu memperkuat ikatan

antara bakteri dan substrat dan menstabilkan koloni dari berbagai pengaruh lingkungan. Pada tahap (iv) *maturation*, biofilm menjadi matur dan bertumbuh menjadi struktur yang terorganisir yang membutuhkan waktu 10 hari atau lebih. Tahapan terakhir yaitu (v) *dispersion*, di mana yang terjadi adalah sel dari biofilm akan melepaskan diri dari koloni untuk kembali menjadi bentuk planktonik lalu menyebar (Salas-Jara, 2016).

Biofilm pada rongga mulut atau plak, dapat mengakibatkan terjadinya karies, terbentuknya kalkulus, terjadinya gingivitis, hingga penyakit periodontal (Darjanki, 2015). Bakteri pembentuk biofilm salah satunya adalah *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus acidophilus* yang membentuk biofilm pada permukaan gigi memiliki peran penting untuk inisiasi dan progresifitas dari karies itu sendiri (Knight, 2008).

Aktivitas bakteri sangat berperan penting pada progresifitas penyakit yang menyerang pulpa, jika lambat laun karies gigi yang telah ada dibiarkan dan tidak dilakukan perawatan, karies akan mencapai jaringan pulpa gigi dan kemudian menjadi pulpitis reversibel (Lumley, 2006). Pulpa akan kehilangan fungsinya jika mengalami peradangan. Salah satu jenis peradangan pulpa adalah pulpitis reversibel. Perawatan pada pulpitis reversibel adalah *pulp capping*. Perawatan *pulp capping* ini dilakukan secara *direct* dan *indirect pulp capping*. Tujuan dari *direct* dan *indirect pulp capping* ini adalah untuk memelihara fungsi dan kesehatan pulpa, karenanya, bahan yang digunakan harus dipertimbangkan dengan baik agar dapat menentukan keberhasilan perawatan (Lu *et al.*, 2008).

Terapi yang sering diterapkan pada kasus ini menggunakan kalsium hidroksida (Ingle *et al.*, 2008) karena kalsium hidroksida telah ditetapkan sebagai



material *gold standard* untuk *direct pulp capping* selama beberapa dekade terakhir. Sifat anti bakteri yang dimiliki oleh kalsium hidroksida mampu meminimalkan atau menghilangkan penetrasi bakteri dan iritasi pada jaringan pulpa. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa mekanisme perbaikan dapat terjadi karena sebagian dari pelepasan molekul bioaktif matriks dentin, termasuk *Bone-Morphogenetic Protein* (BMP) dan *Transforming Growth Factor-Beta One* (TGF- $\beta$ 1). Keduanya terbukti mampu untuk menstimulasi perbaikan pulpa dan remineralisasi dentin (Hilton *et al.*, 2013).

Di samping keuntungan yang telah disampaikan, kalsium hidroksida juga memiliki beberapa kekurangan yaitu memiliki kecenderungan untuk larut, tidak melekat pada dentin, komposit, dentin *bonding*, dan dapat membentuk jembatan dentin yang porus. Dinyatakan juga bahwa kalsium hidroksida memiliki potensial terapeutik jangka lama yang buruk (Devlin, 2006). Kekurangan lain dari kalsium hidroksida yaitu tidak dapat mengeliminasi beberapa macam mikroorganisme yang terdapat dalam tubulus dentin karena ia membutuhkan kontak langsung dengan bakteri dalam sifat antibakterinya yang cenderung menetralkan sistem *buffer* dentin. Kemampuannya, dalam hal ini pH yang tinggi, resisten terhadap beberapa bakteri tertentu, difusi dan daya larut yang rendah, dan menunjukkan peningkatan resorpsi internal pada gigi akibat pulpotomi dengan kalsium hidroksida (Soedjono *et al.*, 2009).

Evaluasi keberhasilan perawatan *pulp capping* dapat dilihat secara radiografis. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Satriya (2016) menyatakan bahwa dari 540 kasus terdapat 201 kasus (37.2%) dikategorikan berhasil, 240 kasus (44.4%) meragukan dan 99 kasus (18.3%) gagal. Kegagalan perawatan *pulp*

*capping* menyebabkan peradangan pada pulpa dan tidak terjadinya proses *healing* karena dentin tersier tidak terbentuk.

Sebagai akibat keterbatasan tersebut, saat ini berbagai material diusulkan sebagai kandidat bahan alternatif untuk bahan *pulp capping*; salah satunya adalah produk yang berasal dari alam, yaitu propolis telah terbukti memiliki sifat antimikroba dan anti-inflamasi yang kuat (Parolia *et al.*, 2010). Penelitian tentang efektivitas kombinasi kalsium hidroksida dengan propolis telah dilakukan (Ehsani *et al.*, 2013).

Propolis merupakan produk lebah yang dimanfaatkan dalam penyembuhan dari berbagai penyakit di dalam dunia pengobatan. Propolis efektif sebagai antikanker, antivirus, antifungi, antioksidan, antiinflamasi, antibakteri, peningkat imunitas tubuh, serta mempercepat dan memperkuat regenerasi sel. (Pranandaru *et al.*, 2013). Dalam praktek kedokteran gigi, propolis telah digunakan karena kemampuannya sebagai anti inflamasi, anti mikroba, anti jamur, dan dapat menyembuhkan bekas luka (Mori *et al.*, 2014). Berdasarkan penelitian Mori *et al.*, (2014), kombinasi kalsium hidroksida dengan propolis tidak menimbulkan reaksi toksik serta evaluasi biokompatibilitas pasta kombinasi kalsium hidroksida dan propolis dalam jaringan subkutan tikus, didapatkan hasil bahwa pasta kombinasi kalsium hidroksida dengan propolis mampu mengurangi inflamasi secara signifikan dan biokompatibel terhadap jaringan ikat tikus.

Selain itu menurut penelitian Widjiastuti (2012) disampaikan bahwa ekstrak propolis dapat menginduksi diferensiasi fibroblas pulpa pada *odontoblast like cells* yang dipapar *Lactobacillus acidophilus* inaktif. Kandungan senyawa aktif pada propolis seperti flavonoid, saponin, tanin, dan *Caffeic Acid Phenethyl*

*Ester* (CAPE) berpotensi sebagai antibakteri. Kandungan senyawa propolis ini berinteraksi dengan DNA bakteri dan menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom. Gugus hidroksil yang terdapat pada struktur senyawa flavonoid menyebabkan perubahan komponen organik dan transpor nutrisi yang menimbulkan efek toksik terhadap bakteri (Ameliana *et al.*, 2014). Sementara menurut Darjanki (2015), senyawa terpen dan turunan fenol memiliki kemampuan dalam menurunkan perlekatan sel mikroba dan pertumbuhan biofilm serta mereduksi sifat hidrofobik bakteri yang merupakan faktor penting dalam proses adhesi bakteri ke substratnya.

Propolis dan kalsium hidroksida masing – masing memiliki daya antibakteri. Namun pada penelitian sebelumnya telah dibuktikan bahwa kalsium hidroksida saja tidak efektif dalam membunuh bakteri. Oleh karena itu, penelitian ini menggunakan propolis yang ditambahkan pada kalsium hidroksida untuk mengetahui peningkatan daya antibakteri terhadap *Lactobacillus acidophilus*.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Apakah paparan kombinasi kalsium hidroksida-propolis dengan perbandingan 1 : 2 dapat menghambat pembentukan biofilm *Lactobacillus acidophilus*?

## **1.3 Tujuan**

### **1.3.1 Tujuan Umum**

Mengetahui pengaruh paparan kombinasi kalsium hidroksida-propolis terhadap hambatan pembentukan biofilm *Lactobacillus acidophilus*.

### **1.3.2 Tujuan Khusus**

Mengetahui nilai dari daya hambat kombinasi kalsium hidroksida-propolis pada pembentukan biofilm *Lactobacillus acidophilus*.

## **1.4 Manfaat Penelitian**

### **1.4.1 Manfaat Teoritis**

Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi tentang kombinasi kalsium hidroksida-propolis terhadap hambatan pembentukan biofilm *Lactobacillus acidophilus*.

### **1.4.2 Manfaat Praktis**

Kombinasi bahan kalsium hidroksida dengan propolis diharapkan menjadi pertimbangan alternatif bahan *pulp capping*.

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

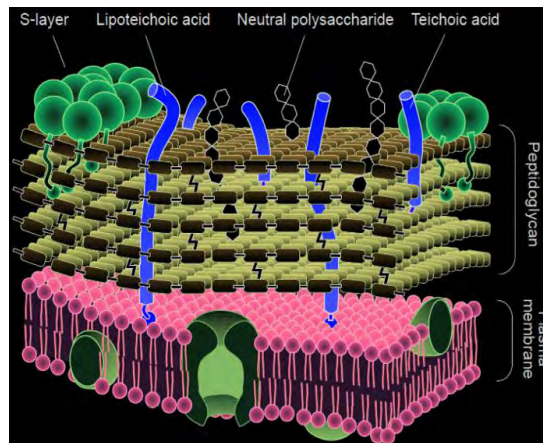
#### 2.1 *Lactobacillus Acidophilus*

##### 2.1.1 Struktur Sel *Lactobacillus acidophilus*

Secara umum genus *Lactobacillus* merupakan bakteri gram positif yang berbentuk kokus atau batang, bersifat nonmotil dan nonspora. Sel bervariasi dari sangat pendek (hampir *coccoid*) hingga batang yang sangat panjang, ramping atau cukup tebal, dan dapat sebagai sel tunggal atau dalam rantai pendek hingga panjang (Jafarei dan Ebrahimi, 2011). Studi awal *L. acidophilus* dilakukan pada strain yang diisolasi dari *fecal* manusia, babi dan ayam.

Selubung sel dari *L. acidophilus* terdiri dari membran sitoplasma, dan dinding sel di atasnya. Dinding memberikan bentuk pada sel, mengelilingi membran sitoplasma, serta melindunginya dari lingkungan. Dinding sel juga membantu pili dan flagella, yang berasal dari membran sitoplasma dan menonjol melalui dinding ke luar. Pelengkap ini membantu *L. acidophilus* untuk bergerak dan melekat pada substrat tertentu. Dinding sel terdiri dari empat komponen penting termasuk peptidoglikan, asam teikoat, S-layer, dan polisakarida.





**Gambar 2.1.1** Struktur dinding sel dari *L. acidophilus* (Jafarei dan Ebrahimi, 2011).

Membran bilipidiplasma dengan protein tertanam dan tertutup oleh selaput peptidoglikan yang terdegradasi yang dihiasi dengan polisakarida netral, asam lipoteikoat dan asam teikoat, dikelilingi oleh lapisan luar protein S-layer (Jafarei dan Ebrahimi, 2011).

Lalu peptidoglikan (murein) adalah komponen esensial dan spesifik dari dinding sel *L. acidophilus* (seperti bakteri Gram positif). Peptidoglikan adalah polimer yang terdiri dari gula dan asam amino yang membentuk lapisan seperti-mesh di luar membran plasma. Komponen gula terdiri dari residu bolak  $\beta$ - (1, 4) asam N-asetilglukosamin dan N-asetilmuramat. Terlampir pada asam N-*acetylmuramic* adalah rantai peptida yang dapat terhubung silang dengan rantai peptida untaian lain dan membentuk lapisan seperti 3D. Fungsi utama peptidoglikan adalah mempertahankan integritas sel dengan menahan turgor. Setiap penghambatan biosintesis atau degradasi spesifiknya selama pertumbuhan sel akan menghasilkan lisis sel. Peptidoglikan juga berkontribusi terhadap pemeliharaan bentuk sel dan berfungsi sebagai perancah untuk penahan komponen sel amplop lain seperti protein dan asam teikoat. Hal ini berkaitan dengan proses pertumbuhan dan pembelahan sel (Vollmer et al., 2008).

Atas dasar pola metabolik dari heksosa dan pentosa, spesies *Lactobacillus*

telah dibagi menjadi tiga kelompok: (i) spesies yang Homofermentatif wajib yang menghasilkan asam laktat sebagai produk akhir utama (> 85%) dari glukosa. *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus salivarius* dan *L. acidophilus* adalah contoh yang paling dikenal dalam kelompok ini. Anggota kelompok ini dapat tumbuh pada 45 ° C tetapi tidak pada 15 ° C. (ii) Spesies Heterofermentatif Fakultatif yang menghasilkan asam laktat sebagai produk akhir utama tetapi mereka tumbuh pada 15 ° C dan menunjukkan pertumbuhan variabel pada 45 ° C yang diwakili oleh *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei* dan *Lactobacillus plantarum*. (iii) Spesies Heterofermentatif yang berkepanjangan yang menghasilkan asam laktat serta CO<sub>2</sub> dan etanol. Spesies perwakilan termasuk *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis* dan *Lactobacillus keferi* (Jafarei dan Ebrahimi, 2011).

### **2.1.2 Metabolisme *Lactobacillus acidophilus***

*Lactobacillus acidophilus* memiliki sifat homofermentatif, yaitu kemampuan untuk memfermentasi gula menjadi asam laktat, dan tumbuh dalam pH yang rendah (pH di bawah 5.0), ia juga memiliki suhu pertumbuhan optimum sekitar 37°C (99°F), dan persentase dalam rongga mulut sebesar 9% dari keseluruhan spesies *Lactobacillus*. Asam laktat yang terbentuk oleh *Lactobacillus* memiliki kemampuan penghambatan terhadap bakteri patogen gram positif dan gram negatif (Darjanki *et al.*, 2015). *Lactobacillus acidophilus* mampu mensintesis polisakarida dari ikatan ekstraseluler glukosa, yang tidak larut, α (1-3), memproduksi asam laktat melalui proses homofermentasi, dan membentuk koloni yang melekat erat pada permukaan gigi (Widjiastuti *et al.*, 2017). Menurut Widjiastuti (2017), bakteri gram positif masuk ke dalam jaringan dentin melalui

proses karies dan merangsang respon imun di pulpa gigi manusia.

Klasifikasi ilmiah *L. acidophilus* adalah (Habibilah, 2009):

Kingdom	: <i>Bacteria</i>
Divisi	: <i>Firmicutes</i>
Kelas	: <i>Bacilli</i>
Famili	: <i>Lactobacillaceae</i>
Genus	: <i>Lactobacillus</i>
Spesies	: <i>L. acidophilus</i>

Salah satu faktor yang dapat mempengaruhi laju *Lactobacillus acidophilus* pada saliva adalah kandungan karbohidrat (Badet dan Thebaud, 2008). Sementara, dalam proses pembentukan karies yang multifaktorial, terjadi interaksi gigi dan saliva sebagai *host*, bakteri normal di dalam mulut serta makanan yang dikonsumsi terutama makanan yang mengandung karbohidrat yang dapat dengan mudah menjadi asam melalui glikolisis pada fermentasi dengan peran *Lactobacillus acidophilus* (Suryadinata, 2012). Bakteri ini menempel pada permukaan gigi untuk memetabolisme karbohidrat dan memproduksi asam organik yang menyebabkan terjadinya penurunan pH mulut secara drastis sehingga menghasilkan demineralisasi enamel gigi (Cura *et al.*, 2012). Perlekatan *Lactobacillus acidophilus* dengan media glukon pada permukaan gigi, di mana produksi glukon merupakan faktor virulensi penting menunjukkan bahwa *Lactobacillus acidophilus* berperan dalam akumulasi dan pembentukan plak. *Lactobacillus acidophilus* memiliki sifat asidogenik dan asidurik yang memicu sintesis glukon sebagai faktor pembentukan biofilm kariogenik. Glukon disintesis

oleh *Lactobacillus acidophilus* dari sukrosa pada permukaan gigi (Widjiastuti, et al., 2017).

## **2.2 Biofilm**

### **2.2.1 Definisi Biofilm**

Biofilm adalah kelompok mikroorganisme terorganisir yang hidup dalam matriks polimer yang diproduksi sendiri dan melekat pada beberapa permukaan (Hurlow *et al.*, 2015). Sementara menurut Salas-Jara (2016), biofilm merupakan komunitas turunan dari bakteri dengan ciri khas sel yang melekat secara ireversibel antar substrat atau antara satu dengan yang lainnya, tertanam dalam matrix dari substansi ekstraseluler polimerik yang diproduksi, dan menampilkan alternasi fenotif dengan transkripsi gen. Biofilm memungkinkan mikroba untuk membentuk komunitas, melekat erat pada permukaan, menghindari kekebalan *host*, serta melawan antibiotik. Mikroorganisme patogen yang membentuk biofilm sangat sulit untuk diatasi (Allewell, 2016). Banyak sel bakteri dan jamur yang memiliki kemampuan untuk membentuk biofilm yang memungkinkan mereka untuk bertahan sebagai suatu komunitas dan melekat erat pada permukaan. Biofilm dapat merupakan agregat mikroba sejenis maupun berbeda jenis. Biofilm ini mampu melekat pada permukaan substrat biologis maupun non biologis di mana terdapat ikatan dan melekat satu sel dengan sel lainnya pada substrat dengan perantara *Extracellular Polymeric Substance* (EPS) (Hall-Stoodley, 2004).

### **2.2.2 Struktur Biofilm**

Biofilm terdiri dari *micro colonies* dari berbagai spesies yang berbeda dari sel mikroba (+15% volume) dan material matriks (+85%). EPS bisa beragam pada

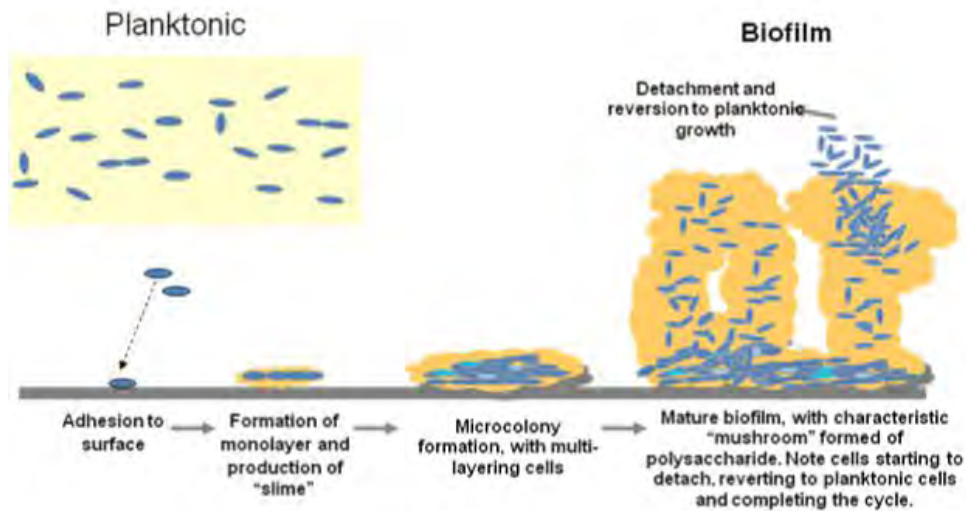
sifat fisik tapi umumnya terdiri dari polisakarida. Beberapa dari polisakarida tersebut adalah netral atau polianion (Kokare *et al.*, 2009).

Material ekstraseluler dalam biofilm memiliki 4 komponen utama, yaitu eksopolisakarida, DNA ekstraseluler, beberapa tipe dari protein, dan vesikel membran luar, di mana seluruh komponen ini memiliki kontribusi tertentu untuk mempromosikan resistensi dari imunitas pejamu. Sifat fisik dari biofilm menghambat penetrasi dari sel pejamu, DNA, ikatan polisakarida dan molekul antimikroba yang diproduksi oleh sel pejamu (Allewell, 2016).

### 2.2.3 Tahapan Pembentukan Biofilm

Pembentukan dan perkembangan biofilm dipengaruhi oleh beberapa faktor, termasuk strain bakteri, kondisi permukaan, dan parameter lingkungan seperti pH, konsentrasi nutrisi, dan suhu. Disampaikan juga oleh Allewell (2016) bahwa pembentukan biofilm memerlukan pergantian dari kehidupan *motile* ke *sessile*, dan generasi dari matriks ekstraseluler. Transisi dari kehidupan yang *motile* ke *sessile* selama pembentukan biofilm ini melibatkan perubahan metabolik, fisiologis, dan fenotip yang saling terkoordinasi oleh jalur sinyal intraseluler yang dapat merespon lingkungan. Messenger kedua *cyclic-di-GMP* (c-di-GMP) berperan sebagai sinyal transduksi untuk banyak jalur. Level seluler dari *c-di-GMP* bergantung pada aktivitas relatif dari enzim, *diguanylate cyclases* (DGCs) dan *fosfodiesterase* (PDEs). Pembentukan biofilm adalah proses perkembangan menggunakan sel c-di-GMP sebagai cek poin untuk transisi antara fase tertentu. Pembentukan ini terdiri dari 5 tahap. Tahap yang pertama adalah (i) *initial attachment* atau perlekatan sel di mana kekuatannya bergantung pada sifat fisikokimia dari permukaan sel bakteri. Perlekatan ini bersifat *reversible* karena

mikroorganisme yang melekat belum menuju ke proses diferensiasi yang memerlukan perubahan morfologis berseri yang mengarah pada pembentukan biofilm. Tahap kedua adalah (ii) *irreversible attachment*. Perubahan ini melibatkan pergeseran dari interaksi bakteri yang lemah dengan permukaan menjadi ikatan permanen dengan kehadiran EPS. Selanjutnya yaitu tahap ketiga (iii) *microcolony formation*. Ditandai dengan agregasi sel menjadi mikrokoloni yang menghasilkan akumulasi dan pertumbuhan dari mikroorganisme yang merupakan awal dari terbentuknya EPS. EPS membantu memperkuat ikatan antara bakteri dan substrat dan menstabilkan koloni dari berbagai pengaruh lingkungan. Pada tahap ini terjadi *Quorum Sensing*, yaitu komunikasi intraseluler antara bakteri oleh produk bakteri yang mampu berdifusi satu dengan yang lain. Produksi dari molekul *Quorum Sensing* diketahui sebagai *acyl-homoserine lactone (acyl-HSL)*. Pada tahap (iv) *maturation*, biofilm menjadi matur dan bertumbuh menjadi struktur yang terorganisir yang membutuhkan waktu 10 hari atau lebih. Tahapan terakhir yaitu (v) *dispersion*, di mana yang terjadi adalah sel dari biofilm akan melepaskan diri dari koloni untuk kembali menjadi bentuk planktonik lalu menyebar (Salas-Jara, 2016 dan Kokare *et al.*, 2009).



**Gambar 2.2.1.** Tahap pembentukan biofilm (Vasudevan R, 2014)

#### 2.2.4 Patogenitas Biofilm

Patogenitas mikroorganisme dari biofilm adalah isu besar dalam dunia kedokteran, karena biofilm sukar untuk diberantas dan menjadi penyebab dari banyak penyakit infeksi kronis (Allewell, 2016). Menurut Salas-Jara (2016), mikroorganisme yang terdapat dalam biofilm menampilkan perilaku yang berbeda dibanding planktonik, mereka akan lebih resisten terhadap perawatan konvensional dengan antibiotik dan mampu menghindari sistem imun dari pejamu. Secara berkala, biofilm mampu meningkatkan kemampuan bakteri untuk mentoleransi antibiotik yang digunakan untuk penyakit infeksius. Pada tingkat molekuler, pompa efluks bekerja untuk menjaga kerendahan konsentrasi intraseluler dari antibiotik dengan menghilangkannya dari sel. Sedangkan pada tingkat seluler, subpopulasi sel atau lebih dikenal sel persisten mempunyai fenotip yang memungkinkan mereka untuk bertahan hidup melawan paparan tinggi dari antibiotik, dan memulai untuk tumbuh kembali ketika antibiotik dihilangkan (Allewell, 2016).

### 2.3 Kalsium Hidroksida

Kalsium hidroksida merupakan bubuk putih tidak berbau dengan rumus kimia  $\text{Ca(OH)}_2$ , yang digunakan sebagai bahan sterilisasi saluran akar untuk perawatan endodontik saat ini. Kalsium hidroksida telah digunakan selama bertahun-tahun dalam dunia kedokteran gigi. Sebagai bahan irigasi, kalsium hidroksida digunakan dalam bentuk larutan dengan konsentrasi 10%, sedangkan sebagai bahan sterilisasi saluran akar, kalsium hidroksida diaplikasikan dalam bentuk pasta *non-setting* atau konus padat. Pemakaian kalsium hidroksida terbanyak terjadi pada sterilisasi saluran akar. Pasta *non-setting* dapat dibuat sendiri dengan mencampurkan serbuk kalsium hidroksida dengan air destilasi, salin, *chlorhexidine*, *chamported chorophenol*, dan lain-lain. Indikasi penggunaannya sebagai material *pulp capping* untuk menginduksi pembentukan *dentin bridge*, sebagai *dressing* saluran akar, membantu penutupan apikal gigi permanen, meningkatkan resolusi lesi periapikal dan *resorptive* serta sebagai desinfektan di ruang saluran akar. Difusi ion hidroksida melalui tubulus dentin dapat berkontribusi terhadap beberapa tindakan yang diantisipasi melalui kerusakan DNA atau denaturasi protein. Pemecahan bahan nekrotik, netralisasi asam dan remineralisasi struktur gigi melalui pelepasan ion kalsium juga dapat berkontribusi pada efek menguntungkan dari kalsium hidroksida (Mulyawati, 2011; Mohammadi dan Dummer 2011; Whitbeck, 2011).

Selama beberapa dekade kalsium hidroksida telah menjadi bahan baku untuk mempertahankan vitalitas pulpa. Baik secara klinis dan histologis telah ditemukan untuk menghasilkan hasil yang memuaskan dalam *pulp capping* langsung dan tidak langsung, karena mampu menstimulasi pembentukan dentin



tersier oleh pulpa. Dalam kontak dengan jaringan pulpa vital, ia berkontribusi terhadap pembentukan dentin reparatif, varian khusus dentin tersier, yang menutup eksposur oleh jaringan keras yang baru terbentuk. Hal ini telah dibuktikan oleh penelitian dasar dan studi klinis dengan tingkat keberhasilan yang dilaporkan lebih dari 80% untuk *direct pulp capping* (Danmaschke, 2012).

## 2.4 Propolis

Propolis berasal dari bahasa Yunani, yaitu *pro* berarti pertahanan dan *polis* berarti kota, sehingga propolis bermakna pertahanan kota (atau sarang lebah). Propolis merupakan salah satu produk alam yang dihasilkan oleh lebah yang telah lama dikenal dan dimanfaatkan karena khasiatnya dalam menyembuhkan berbagai macam penyakit. Lebah menghasilkan produk lain selain propolis seperti *royal jelly*, *polen*, *venom* dan *propolis*. Propolis atau lem lebah adalah nama generik yang diberikan untuk bahan resin yang dikumpulkan oleh lebah madu (*Apis mellifera*) dari berbagai macam jenis tumbuhan, terutama dari bagian kuncup dan daun tumbuhan tersebut (Santoso *et al.*, 2012). Propolis mengandung ratusan bahan kimia, namun para peneliti baru dapat mengidentifikasi beberapa diantaranya (Parolia, 2010). Berdasarkan beberapa substansi yang terdapat pada propolis dari beberapa tempat, secara garis besar propolis mengandung asam aromatik dan ester, *chalcones*, flavonoid, terpenoid dan *waxy acid*. Sebagian besar aktivitas biologis dari propolis berasal dari adanya flavonoid (Liberio *et al.*, 2009).

Secara umum propolis mengandung resin dan balsam (50 –70%), minyak essensial dan lilin lebah (30 –50%), pollen (5-10%) dan beberapa kandungan lain

seperti asam amino, mineral, vitamin A, B kompleks, E dan substansi biokimia yang sangat aktif yaitu flavonoid, fenol dan komponen aromatik lain. Propolis mengandung dua belas macam flavonoid yang berbeda seperti : apigenin, tt-farnesol, quercetin, pinocembrin, acacetin, chrysin, rutin, katekin, naringenin, galangin, luteolin, kaempferol, dan myricetin, dua *phenolic acid*, *cinnamic acid* dan *caffeic acid*, dan satu derivat stilbene, resveratrol. Propolis mengandung beberapa mineral seperti Mg, Ca, I, K, Na, Cu, Zn, Mn dan Fe dan beberapa vitamin seperti B1, B2, B6, C dan E serta beberapa asam lemak. Propolis juga mengandung beberapa enzim seperti *succinic dehydrogenase*, *glucose-6-phosphatase*, *adenosine triphosphatase* dan *acid phosphatase* (Liberio *et al.*, 2009 dan Ahuja., 2011).

## 2.5 Kombinasi Kalsium Hidroksida-Propolis

Kalsium hidroksida yang dikombinasikan dengan propolis terbukti tidak menimbulkan reaksi yang bersifat toksik. Dalam penelitian tersebut dilakukan uji biokompatibilitas pasta kalsium hidroksida dan propolis dalam jaringan subkutan tikus, didapatkan hasil bahwa pasta kalsium hidroksida dan propolis mampu mengurangi inflamasi secara signifikan dan biokompatibel dengan jaringan ikat tikus. Sifat antibakteri dari kalsium hidroksida dan propolis memiliki aktivitas dalam melawan *Lactobacillus acidophilus* dan dapat menghambat aktivitas *gtf*. (Mori *et al.*, 2014).

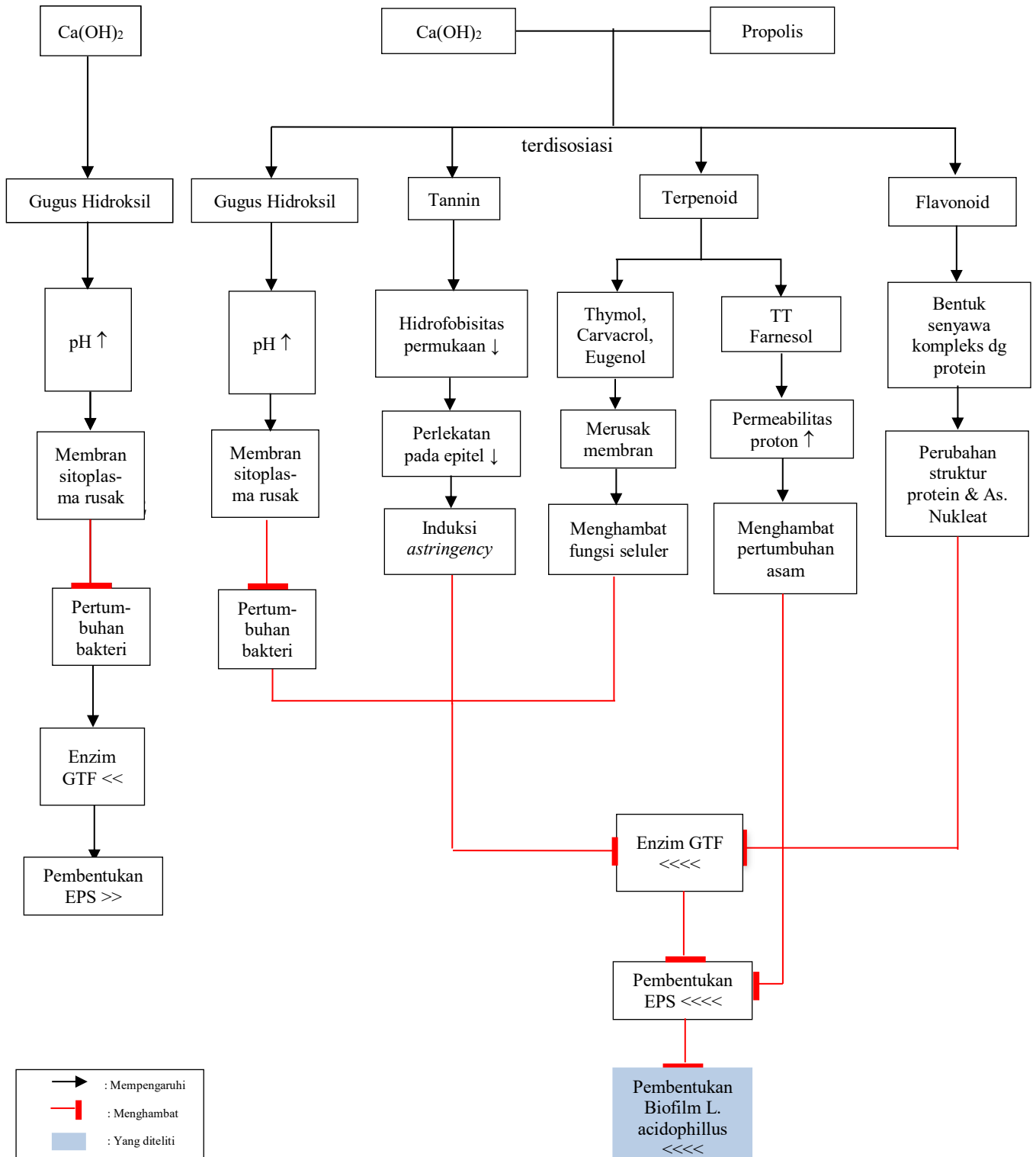
Menurut penelitian Montero dan Mori tahun 2012, penggunaan kombinasi kalsium hidroksida dan propolis dengan perbandingan 1:2, 1 bubuk kalsium hidroksida dan 2 ekstrak propolis, sangat dianjurkan karena kalsium hidroksida mampu berdisosiasi lebih baik menjadi ion kalsium dan ion hidroksil sehingga

ion-ion tersebut mampu berdifusi secara baik ke dalam tubuli dentin. Selain itu, diperkuat berdasarkan penelitian yang dilakukan Asmoro tahun 2014, kalsium hidroksida yang dikombinasikan dengan ekstrak propolis memiliki daya antibakteri lebih tinggi dibandingkan tanpa propolis. Kalsium hidroksida harus dikombinasikan dengan cairan karena serbuk kalsium hidroksida sulit dimasukkan ke dalam saluran akar dan cairan diperlukan untuk melepas ion hidroksilnya. Disampaikan juga bahwa kalsium hidroksida harus bekerja berdampingan dengan suatu material pembawa (kendaraan) untuk digunakan sebagai pasta, bahan pembawa ini nantinya akan menentukan derajat disosiasi menjadi ion dan difusi pada tubulus dentinalis. Bahan pembawa ini sangat mempengaruhi kelarutan pasta dan kemampuannya untuk diresorpsi oleh jaringan apikal, serta dapat menanggung keefektifan pasta kalsium hidroksida karena pengaruhnya pada difusi dan disosiasi ion (Montero J.C, & Mori, G.G., 2012).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



### **Keterangan Kerangka Konseptual**

Kalsium hidroksida yang merupakan *gold standard* pada perawatan *pulp capping*. Efek anti bakteri pada kalsium hidroksida didapat dari pelepasan gugus hidroksil yang menciptakan suasana basa, yaitu dengan pH 12,5. Kondisi tidak kondusif yang diciptakan oleh lingkungan yang alkali ini mampu merusak membran sitoplasma. Kerusakan membran sitoplasma mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Hal ini menyebabkan produksi enzim GTF ada namun tidak terlalu banyak sehingga pembentukan EPS tetap terjadi.

Ikatan Van Der Waals akan menyebabkan terbentuknya senyawa garam kalsium dari kombinasi kalsium hidroksida-propolis. Lalu ikatan tersebut akan terdisosiasi sehingga muncul berbagai macam senyawa aktif. Yang berperan sebagai senyawa aktif dari propolis adalah tannin, gugus hidroksil, terpenoid, dan flavonoid sementara dari kalsium hidroksida adalah gugus hidroksil.

Cara kerja tannin adalah menurunkan hidrofobisitas pada permukaan sel yang mengakibatkan turunnya perlekatan pada epitel. Penurunan perlekatan pada epitel ini juga menyebabkan terinduksinya keadaan *astringency* sehingga perlekatan semakin terhambat begitu pula dengan produksi enzim GTF. Seperti kita ketahui, bahwa enzim GTF sangat berguna untuk perlekatan awal suatu bakteri dalam biofilm, produksi enzim GTF ini juga mampu dihambat oleh thymol, carvacrol, dan eugenol yang ada dalam kandungan terpenoid. Thymol, carvacrol, dan eugenol mampu merusak membran sehingga menghambat fungsi seluler yang dibutuhkan untuk memproduksi enzim tersebut. Terpenoid juga mengandung TT Farnesol yang mampu meningkatkan permeabilitas proton sehingga menghambat pertumbuhan asam. Lain dengan thymol, carvacrol, dan

eugenol, TT Farnesol berfungsi menghambat pembentukan EPS. Senyawa yang juga menghambat pembentukan EPS adalah flavonoid. Flavonoid mampu membentuk senyawa kompleks dengan protein yang menyebabkan perubahan struktur protein dan asam nukleat sehingga terjadi denaturasi protein pembentuk EPS.

Melalui proses penghambatan produksi enzim GTF oleh tannin, gugus hidroksil dan tymol, carvacrol, eugenol serta penghambatan pada pembentukan EPS oleh TT Farnesol dan flavonoid, pembentukan biofilm *Lactobacillus acidophilus* juga akan terhambat.

### **3.3 Hipotesis Penelitian**

Kombinasi kalsium hidroksida-propolis dengan perbandingan 1 : 2 dapat menghambat pertumbuhan biofilm *Lactobacillus acidophilus*

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Penelitian

Jenis penelitian adalah eksperimental laboratories *in vitro* dengan rancangan penelitian *post test only control group design*.

#### 4.2 Sampel Penelitian dan Besar Sampel

##### 4.2.1 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan adalah stok biofilm bakteri *Lactobacillus acidophilus*.

##### 4.2.2 Besar Sampel

Besar sampel dihitung dengan menggunakan rumus Lemeshow (1990):

$$\frac{2 \cdot (SD)^2 \cdot (1.96 + 0.84)^2}{(\text{mean } k_1 - \text{mean } k_2)^2} =$$

$$\frac{2 \cdot (0.12)^2 \cdot 7.84}{(0.661375 - 0.387775)^2}$$

$$= 3.05$$

Keterangan:

SD : Standar Deviasi

Mean  $k_1$  : Rata – rata kelompok kontrol

Mean  $k_2$  : Rata – rata kelompok perlakuan

Dalam penelitian ini terdapat 2 perlakuan yang menunjukkan jumlah sampel minimal adalah 3. Digunakan 8 (delapan) replikasi sampel agar data lebih akurat dan tepat untuk masing-masing kelompok perlakuan.

### **4.3 Variabel Penelitian**

#### **4.3.1 Variabel Bebas**

Kombinasi kalsium hidroksida-propolis

#### **4.3.2 Variabel Terikat**

Hambatan pembentukan biofilm bakteri *Lactobacillus acidophilus*

#### **4.3.3 Variabel Terkendali**

- a. Jenis kalsium hidroksida (pro analisa, Merck, *Germany*)
- b. Jenis propolis (lebah *Apis Mellifera*)
- c. Konsentrasi ekstrak propolis dalam kombinasi kalsium hidroksida-propolis
- d. Media yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri *Lactobacillus acidophilus*
- e. Peralatan yang digunakan selama penelitian
- f. Suhu dan lama waktu inkubasi
- g. Cara pengukuran

### **4.4 Definisi Operasional**

- a. Kombinasi kalsium hidroksida–propolis adalah bubuk kalsium hidroksida yang telah ditambahkan dengan larutan ekstrak propolis dengan perbandingan 1 : 2



- b. *Lactobacillus acidophilus* diperoleh dari laboratorium mikrobiologi di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang
- c. Biofilm bakteri *Lactobacillus acidophilus* adalah hasil pembiakan bakteri *Lactobacillus acidophilus* pada *Trypticase Soy Broth* (TSB) pada tabung reaksi
- d. Hambatan biofilm adalah penurunan pembentukan biofilm yang diteliti berdasarkan nilai *Optical Density* (OD) yang diamati melalui ELISA *Reader* dengan panjang gelombang 570 nm.

## **4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian**

### **4.5.1 Lokasi Penelitian**

- a. Balai Penelitian dan Konsultasi Industri Laboratorium Ketintang, Surabaya-Jawa Timur
- b. Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang-Jawa Timur

### **4.5.2 Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan dalam waktu dua bulan, dimulai pada bulan Mei-Juli 2018.

## **4.6 Alat dan Bahan**

### **4.6.1 Alat**

- a. *96 Well flat-bottomed plastic tissue culture plate*
- b. Ose
- c. *Shaker water bath*
- d. *Rotary Vaccum Evaporator*

- e. Cawan petri
- f. Tabung reaksi
- g. Mikropipet
- h. ELISA *reader* dengan panjang gelombang 570 nm
- i. Vortex
- j. Brander dan *spreader*
- k. Inkubator (*Memmert, Germany*)
- l. Autoclave (*Tomy, Japan*)
- m. Anaerobic jar
- n. Neraca Analitik

#### 4.6.2 Bahan

- a. *deMann Rogosa Sharpe Broth* (MRSB) + glu
- b. Biakan bakteri *Lactobacillus acidophilus* yang dapat membentuk biofilm
- c. Ekstrak propolis lebah *Apis Mellifera*
- d. Kalsium hidroksida pro analisa Merck, *Germany*
- e. *Aquadest*
- f. Larutan (PBS) *phosphate-buffered saline* (pH 7,4)
- g. Glukosa 1%
- h. *Crystal Violet* 0,1%
- i. *Aluminium foil*
- j. Isopropanol
- k. Etanol 96%

## 4.7 Prosedur Penelitian

### 4.7.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini disterilkan dalam *autoclave* dengan suhu 121°C selama 30 menit.

### 4.7.2 Pembuatan Ekstrak Propolis

Sebanyak 0,5 kg propolis lebah *Apis mellifera* diiris iris dengan ketebalan 0,5 – 1 mm kemudian dimasukkan ke dalam ekstraktor. Selanjutnya ditambahkan 0,5 L etanol 96% lalu dicampur hingga seluruh propolis terendam. Setelah itu, dimasukkan ke dalam alat *shaker* dengan kecepatan 80 rpm untuk digoyang agar terjadi kontak berkali – kali sehingga homogen selama 24 jam lalu dihentikan dan disaring. Setelah itu diuapkan dengan alat *evaporator vacuum* dengan suhu 50 - 60°C untuk memisahkan ekstrak propolis dengan etanol sehingga diperoleh cairan kental kecoklatan dari ekstrak propolis. Pembuatan formulasi larutan propolis dengan konsentrasi 8% menggunakan metode pengenceran dari larutan ekstrak propolis 11,45% dengan menggunakan aquades steril. Pengenceran dilakukan dengan menggunakan rumus perbandingan konsentrasi dan volume sebagai berikut:

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

M menunjukkan konsentrasi dan V menunjukkan volume, untuk kedua larutan dengan konsentrasi yang berbeda.

### 4.7.3 Pembuatan Sampel Kombinasi Kalsium Hidroksida-Propolis

1. Kombinasi kalsium hidroksida dengan propolis yaitu mencampur bubuk kalsium hidroksida 0,125 gram dengan ekstrak propolis 0,25 ml (1:2), sebagai kelompok perlakuan kultur bakteri pada media MRSB dengan 1% glukosa

(MRSBglu) dengan penambahan kombinasi kalsium hidroksida-propolis serta pada kontrol hanya kultur bakteri pada media MRSB dengan 1% glukosa.

2. Setelah dicampur, ditambahkan *aquadest* kurang lebih 85 ml sedikit demi sedikit sehingga diperoleh larutan 100 ml
3. Dimasukkan ke dalam tabung reaksi, inkubasi selama 1x24 jam

#### **4.7.4 Persiapan bakteri *Lactobacillus acidophilus***

1. Stok bakteri *Lactobacillus acidophilus* di subkultur dengan metode *streaking quadran* pada medium *deMann Rogosa Sucrose Agar (MRS-A)*, lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam
2. Setelah didapatkan subkultur koloni murni, diambil 1 koloni untuk dimasukkan ke dalam 10 ml medium MRS-Broth-glu lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam
3. Diukur nilai absorbansi (*Optical Density*) subkultur pada medium MRS-Broth-glu dengan spektrofotometri (panjang gelombang 625 nm)
4. Hasil di encerkan dengan NaCl 0,9 % hingga nilai OD menjadi 0,1 maka didapatkan suspensi bakteri *Lactobacillus acidophilus* 10<sup>8</sup>/ml yang siap digunakan untuk kerja uji hambat biofilm.

#### **4.7.5 Pemberian kombinasi Kalsium Hidroksida-Propolis pada *Lactobacillus acidophilus***

1. Masukkan 100 µl suspensi bakteri ke *well microtitter plate* lalu inkubasikan selama 24 jam.
2. Tambahkan kombinasi kalsium hidroksida-propolis (1:2) sebanyak 100 µl lalu inkubasikan kembali selama 24 jam.

3. Kemudian tiap-tiap *microtiter plate* diaspirasi dengan mencuci sebanyak 3 kali dengan 200  $\mu$ l *Phosphate-Buffered Saline* (PBS pH 7,4) menggunakan mikropipet. Tujuannya untuk menghilangkan sisa-sisa bakteri planktonik lalu dikeringkan.

#### **4.7.6 Pewarnaan biofilm *Lactobacillus acidophilus***

1. Setelah kering, dilakukan pewarnaan pada mikroorganisme yang menempel pada *well microtiter plate* menggunakan Crystal Violet 2% sebanyak 200  $\mu$ l dan diinkubasikan pada suhu ruang selama 15 menit
2. Dengan mikropipet, Crystal Violet 2% sebanyak 200  $\mu$ l dibuang, lalu dibilas 3 kali dengan PBS (pH 7,4) kemudian dikeringkan di inkubator 37<sup>0</sup> C selama 24 jam

#### **4.7.7 Pengamatan Daya Hambat Pembentukan Biofilm**

1. Selanjutnya *microtiter plate* di tambahkan larutan pada masing-masing *well* dengan Isopropanol 200  $\mu$ l
2. *Microtiter plate* digoyang pelan selama 1 menit kemudian diletakkan ke dalam *ELISA reader* untuk diketahui nilai OD pada masing-masing sampel dengan panjang gelombang 570 nm.

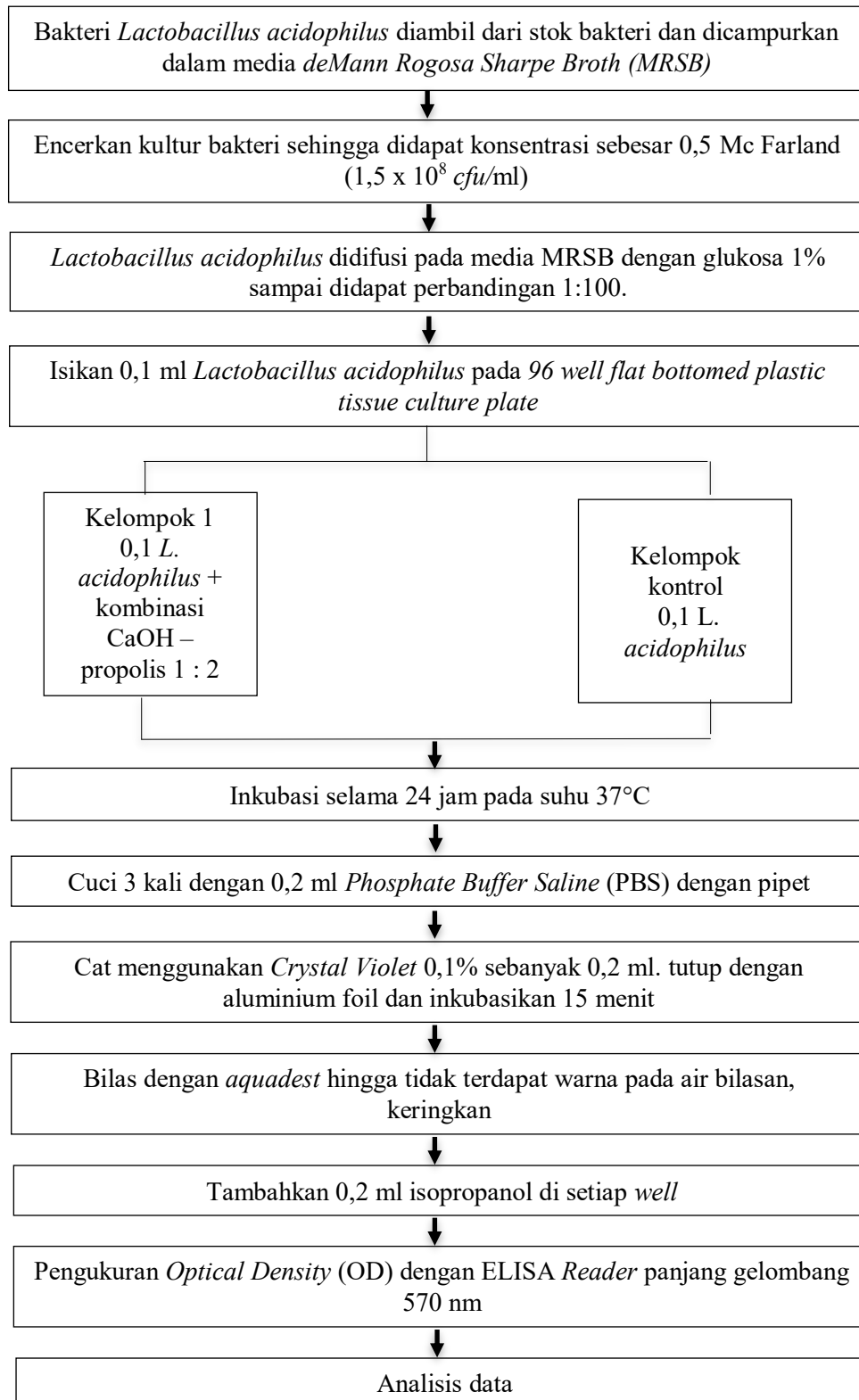
#### **4.8 Penghitungan dan Analisis Data**

Data yang diperoleh merupakan data kuantitatif berupa nilai absorbansi atau *Optical Density* (OD). Daya hambat diketahui berdasarkan pengukuran OD yang didapat melalui pembacaan *ELISA Reader*. Aktivitas penghambatan dihitung menggunakan rumus dengan modifikasi menurut Darjanki, 2015:

$$\% \text{ daya hambat} = \frac{\text{mean OD kontrol negatif} - \text{mean OD sampel eksperimental}}{\text{mean OD kontrol negatif}} \times 100\%$$

- a) Uji Normalitas menggunakan *One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test* untuk melihat apakah data yang diperoleh berdistribusi normal.
- b) Uji perbedaan/parametrik menggunakan *Independent Samples T-Test* untuk menguji perbedaan rata-rata hitung karena kelompok sampel yang diuji adalah 2 kelompok.

#### 4.9 Alur Penelitian

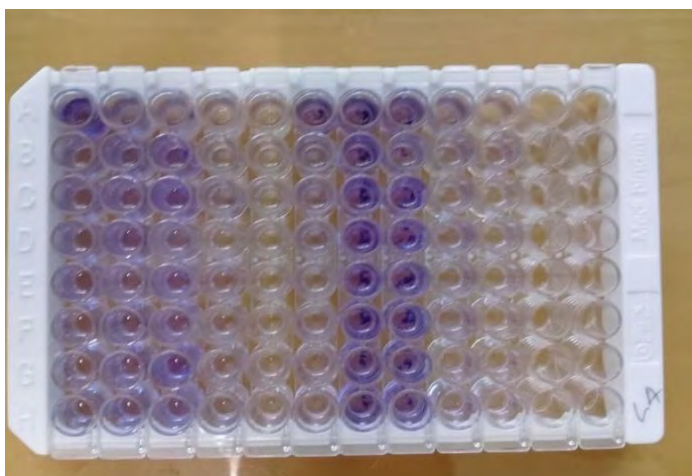


## BAB 5

### HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

#### 5.1 Hasil Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh paparan kombinasi kalsium hidroksida-propolis terhadap hambatan pembentukan biofilm *Lactobacillus acidophilus* menggunakan unit eksperimen yang terdiri dari kelompok kontrol negatif ( 0,1 *Lactobacillus acidophilus* ) dan kelompok perlakuan ( kombinasi kalsium hidroksida-propolis dengan perbandingan 1 : 2 ), dengan tiap kelompok unit eksperimen terdiri dari 8 replikasi.



**Gambar 5.1.** *Microtiter plate* yang sudah dilakukan uji hambat pembentukan biofilm dan akan dibaca nilai OD-nya dengan *ELISA Reader*



KELOMPOK	JUMLAH SAMPEL	RERATA	SD	PERSENTASE OD
Kontrol Negatif	8	0,33413	0,085097	100%
Perlakuan	8	0,72838	0,017386	41,45%

**Tabel 5.1** Nilai rerata dan standar deviasi dari hasil *Optical Density*

Keterangan tabel:

- Kontrol negatif : 0,1 *Lactobacillus acidophilus*
- Perbandingan 1 : 2 : Kombinasi kalsium hidroksida-propolis 1 : 2

Pada hasil pembacaan OD didapatkan nilai OD sampel lebih kecil dibanding kelompok kontrol, yaitu 41,45% dibanding 100% yang berarti kombinasi kalsium hidroksida-propolis dengan perbandingan 1:2 mampu menghambat pertumbuhan biofilm *Lactobacillus acidophilus* sebesar 41,45% dari jumlah bakteri yang sedang tumbuh pada kontrol negatif.

## 5.2 Analisa Statistik

Hasil penelitian ini menggunakan analisa statistic SPSS versi 20. Data hasil pengukuran OD (*Optical Density*) biofilm dengan menggunakan *ELISA Reader* dianalisis menggunakan uji *One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test* untuk melihat normalitas distribusi data.

Kelompok Perlakuan	Signifikansi
Kontrol negatif	0.691 (p>0.05)
Perlakuan	0.992 (p>0.05)

**Tabel 5.2** Hasil uji normalitas *One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test*

Dari uji normalitas ini didapatkan nilai  $p > 0.05$  pada semua kelompok perlakuan, hal ini berarti bahwa hasil penelitian yang diperoleh berdistribusi normal.

Setelah diketahui bahwa data hasil penelitian berdistribusi normal, maka selanjutnya dilakukan uji beda rerata *Independent Samples T-Test* untuk data parametris dengan 2 kelompok sehingga terlihat signifikansi perbedaan.

<b>Kelompok</b>	<b>Kontrol</b>
Perlakuan	0.000 *

**Tabel 5.3** Hasil uji beda rerata *Independent Samples T-Test*

Keterangan tabel:

\* : Ada perbedaan signifikan

Dari perhitungan tersebut, nilai  $p < 0,05$  yang berarti terdapat perbedaan yang bermakna antara sampel dan kelompok kontrol.

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Di antara beragam spesies *Lactobacillus sp.* yang telah teridentifikasi, *Lactobacillus acidophilus* adalah spesies paling banyak ditemukan pada saliva penderita karies. Bakteri ini menempel pada permukaan gigi untuk memetabolisme karbohidrat dan memproduksi asam organik yang menyebabkan terjadinya penurunan pH mulut secara drastis sehingga menghasilkan demineralisasi enamel gigi (Cura *et al.*, 2012). Bakteri *Lactobacillus acidophilus* mampu membentuk biofilm pada permukaan gigi yang memiliki peran penting untuk inisiasi dan progresifitas dari karies itu sendiri (Knight, 2008). Jika lambat laun karies gigi yang telah ada dibiarkan dan tidak dilakukan perawatan, karies akan mencapai jaringan pulpa gigi dan kemudian menjadi pulpitis reversibel (Lumley, 2006).

*Gold standard therapy* pada kasus ini adalah pemberian kalsium hidroksida (Ingle *et al.*, 2008), namun karena banyak kekurangan yang dihasilkan maka kalsium hidroksida dikombinasikan dengan bahan alami propolis ditunjang dengan penelitian oleh Ehsani (2013) tentang efektivitas kombinasi kalsium hidroksida dengan propolis. Hal ini juga sesuai dengan penelitian Asmoro (2014) yang menyatakan bahwa kalsium hidroksida yang dikombinasikan dengan ekstrak propolis memiliki daya antibakteri lebih tinggi dibandingkan tanpa propolis.

Penelitian eksperimental laboratoris terhadap biofilm *Lactobacillus acidophilus* ini dilaksanakan secara *in vitro* dengan *well microtitter plate* dengan hasil berupa nilai *Optical Density* (OD) biofilm yang diukur dengan *ELISA*

*Reader* panjang gelombang 570 nm. Pada penelitian ini, digunakan kombinasi dari hasil penelitian Leo (2017) yang membandingkan 3 perbandingan, yaitu 1 : 1 ; 1 : 1.5 ; dan 1 : 2. Dari penelitian tersebut didapatkan hasil kombinasi kalsium hidroksida-propolis dengan perbandingan 1 : 2 adalah perbandingan yang paling efektif untuk menghambat kolonisasi bakteri *Lactobacillus acidophilus*. Juga didukung oleh penelitian dari Montero dan Mori (2012) yang mengatakan bahwa pada kombinasi kalsium hidroksida-propolis dengan perbandingan 1 kalsium hidroksida dan 2 propolis, kalsium hidroksida mampu berdisosiasi lebih baik menjadi ion kalsium dan ion hidroksil sehingga ion-ion tersebut mampu berdifusi secara baik ke dalam tubuli dentin. Jika dibandingkan dengan perbandingan yang lainnya, perbandingan 1 : 2 merupakan yang paling efektif karena semakin banyak ekstrak propolis yang dipakai dalam campuran kalsium hidroksida-propolis maka semakin efektif campuran tersebut menghambat kolonisasi bakteri. Namun, menambahkan penggunaan ekstrak propolis terus-menerus dalam campuran kalsium hidroksida-propolis tidak mungkin dapat dilakukan karena akan mempengaruhi konsistensi campuran menjadi semakin cair dan akan memakan waktu yang sangat lama untuk mengeras. Jadi perbandingan 1 : 2 adalah perbandingan yang paling baik.

Menurut perhitungan besar sampel sebelumnya, jumlah minimal replikasi sampel adalah 3 replikasi, namun pada penelitian kali ini, dilakukan sebanyak 8 kali replikasi untuk hasil yang lebih akurat. Didapatkan hasil berupa nilai OD yang tidak terlalu konsisten antar replikasi. Kemudian dilakukan perhitungan rata-rata per kelompok dan persentase pertumbuhan biofilm menggunakan rumus. Setelah dihitung didapatkan hasil 41,45% pada kelompok sampel, sementara

didapatkan 100% pada kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa pada kelompok sampel, sisa biofilm yang masih bertumbuh hanya 41,45%, jauh lebih sedikit dibanding jumlah biofilm yang tumbuh pada kontrol negatif, yaitu 100%. Perbedaan nilai OD pada 8 replikasi kelompok sampel dapat disebabkan oleh berbagai macam faktor, salah satunya adalah adanya sedikit perbedaan waktu saat memberikan kombinasi kalsium hidroksida-propolis pada masing-masing *well* serta suhu ruangan yang dapat berbeda karena selisih waktu pemberian kombinasi.

Penghambatan pembentukan biofilm terjadi secara multifaktorial. Jika dicampur dengan ekstrak propolis, kalsium hidroksida akan membentuk senyawa garam kalsium yang terjadi karena adanya ikatan Van Der Waals yang terdisosiasi sehingga muncul berbagai macam senyawa aktif seperti flavonoid, tannin, gugus hidroksil, dan terpenoid. Suasana basa yang diciptakan yaitu dengan pH 12,5 yang membuat suasana menjadi tidak kondusif sehingga dapat merusak membran sitoplasma. Kerusakan membran sitoplasma menyebabkan produksi enzim GTF sedikit menurun. Cara kerja tannin adalah menurunkan hidrofobisitas pada permukaan sel yang mengakibatkan turunnya perlekatan pada epitel (Chusri *et al*, 2012). Penurunan perlekatan pada epitel ini juga menyebabkan terinduksinya keadaan *astringency* (Bakkiyaraj *et al*, 2013) sehingga perlekatan semakin terhambat begitu pula dengan produksi enzim GTF (Regita, 2018; Citra, 2009). Seperti kita ketahui, bahwa enzim GTF sangat berguna untuk perlekatan awal suatu bakteri dalam biofilm, produksi enzim GTF ini juga mampu dihambat oleh *thymol*, *carvacrol*, dan *eugenol* yang ada dalam kandungan terpenoid. *Thymol*, *carvacrol*, dan *eugenol* mampu merusak membran sehingga menghambat fungsi

seluler (Raut *et al.*, 2013). TT-Farnesol pada terpenoid juga mampu meningkatkan permeabilitas proton sehingga menghambat pertumbuhan asam, ia juga mampu menghambat penyusunan EPS (Jeon *et al.*, 2011). Selain itu flavonoid mampu membentuk senyawa kompleks dengan protein yang menyebabkan perubahan struktur protein dan asam nukleat sehingga terjadi denaturasi protein penyusun EPS (Asmoro, 2016). Melalui proses penghambatan produksi enzim GTF oleh *tannin*, gugus hidroksil dan *thymol*, *carvacrol*, *eugenol* serta penghambatan pada penyusunan EPS oleh TT-Farnesol dan flavonoid, pembentukan biofilm *Lactobacillus acidophilus* juga akan terhambat.

Biofilm adalah kelompok mikroorganisme terorganisir yang hidup dalam matriks polimer yang diproduksi sendiri dan melekat pada beberapa permukaan (Hurlow *et al.*, 2015). Pembentukan dan perkembangan biofilm dipengaruhi oleh beberapa faktor, termasuk strain bakteri, kondisi permukaan, dan parameter lingkungan seperti pH, konsentrasi nutrisi, dan suhu. Pada penelitian ini, digunakan bakteri dengan pasase ke empat. Hal ini juga dapat mempengaruhi hasil penelitian yang kurang signifikan karena patogenitas bakteri tersebut. Pada penelitian ini, koloni bakteri diambil lalu dimasukkan pada medium MRS-Broth-glu dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah itu suspensi dimasukkan ke dalam *well microtiter plate* dan diinkubasi kembali selama 24 jam. Terakhir, memasukkan kombinasi kalsium hidroksida-propolis ke dalam *well microtiter plate* dan diinkubasi kembali selama 24 jam. Menurut Salas-Jara, 2016 dan Kokare *et al.*, 2009 membutuhkan 10 hari atau lebih untuk membuat biofilm menjadi matur, masuk tahapan ke empat dalam pembentukan biofilm yaitu maturasi dan bertumbuh menjadi struktur yang terorganisir. Maka pada penelitian ini diberikan

kombinasi kalsium hidroksida-propolis setelah suspensi diinkubasi total selama 2x24 jam. Dengan begitu diharapkan pembentukan biofilm telah mencapai tahap kedua yaitu *irreversible attachment* yang melibatkan pergeseran dari interaksi bakteri yang lemah dengan permukaan menjadi ikatan permanen dengan kehadiran EPS.

Sementara sebelum pemberian kombinasi, untuk membuktikan bahwa *Lactobacillus acidophilus* yang digunakan sudah mulai bertumbuh menjadi biofilm, kelompok tanpa perlakuan diobservasi dengan *Scanning Electron Microscope* (SEM). Observasi dilakukan dengan 4 perbesaran, yaitu 500x, 2000x, 5000x, dan 15000x. dari keempat perbesaran tersebut, hasil yang didapat tidak cukup memuaskan. Harapannya, terdapat secara jelas bentukan seperti jala atau benang yang membentang di antara badan satu dengan badan yang lainnya. Namun, hasil yang didapat tidak begitu jelas terlihat. Kegagalan dalam observasi dengan SEM ini kemungkinan dapat disebabkan oleh pasase bakteri yang telah mengalami pasase keempat. Seperti kita ketahui bahwa semakin sering bakteri itu dikultur, maka pasasenya semakin besar yang menandakan bahwa sifat-sifat yang dimiliki bakteri induk tersebut sudah tidak diwariskan semua. Hal ini dapat berakibat ke pembacaan hasil SEM yang kurang maksimal.

Secara keseluruhan penelitian ini sesuai dengan hipotesis yaitu mampu membuktikan adanya hambatan pembentukan biofilm *Lactobacillus acidophilus* akibat paparan kombinasi kalsium hidroksida-propolis dengan perbandingan 1 : 2.

## BAB 7

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1 Kesimpulan

Paparan kombinasi kalsium hidroksida-propolis dengan perbandingan 1 : 2 dapat menghambat pembentukan biofilm *Lactobacillus acidophilus*.

#### 7.2 Saran

Dapat dilakukan penelitian lebih lanjut tentang kandungan CAPE terhadap hambatan pembentukan biofilm *Lactobacillus acidophilus* karena CAPE merupakan salah satu kandungan terbesar pada propolis.



**DAFTAR PUSTAKA**

- Ahuja, V. and Ahuja, A., 2011. Apitherapy-A sweet approach to dental diseases. Part II: Propolis. *JoAOR*, 2(2):1-8.
- Allewell, N.M., 2016. Introduction to biofilms thematic minireview series. *JBC*, 291(24):12527-12528
- Ameliana Y. 2014. Daya antibakteri penambahan propolis pada zinc oxide eugenol dan zinc oxide terhadap kuman campur gigi molar sulung nonvital. *Skripsi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya*. 200.
- Asmoro, FF. 2016. Perbedaan daya antibakteri kalsium hidroksida dengan dan tanpa penambahan propolis terhadap *Enterococcus faecalis*. *Skripsi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya*.
- Badet, C. and Thebaud, N.B., 2008. Ecology of lactobacilli in the oral cavity: a review of literature. *Open Microbiol J*, 2:38-48.
- Bakkiyaraj, D., Nandhini, J.R., Malathy, B. and Pandian, S.K., 2013. The anti-biofilm potential of pomegranate (*Punica granatum L.*) extract against human bacterial and fungal pathogens. *Biofouling*, 29(8):929-937.
- Chusri, S., Phatthalung, P.N. and Voravuthikunchai, S.P., 2012. Anti- biofilm activity of *Quercus infectoria G. Olivier* against methicillin- resistant *Staphylococcus aureus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 54(6):516.
- Citra, D.A., Nirwani, B., Nurmasitoh, T. and Bowo, E.T., 2009. Manfaat Sirih Merah (*Piper crocatum*) sebagai Agen Anti Bakterial terhadap Bakteri Gram Positif dan Bakteri Gram Negatif. *JKKI*, 1(1):2-3.
- Cura, F., Palmieri, A., Girardi, A., Martinelli, M., Scapoli, L. and Carinci, F., 2013. Lab-Test® 4: Dental caries and bacteriological analysis. *J Dent Res*,

1(1):39-41.

Dammaschke, T., 2012. A new bioactive cement for direct pulp capping. *Int Dent-Aust ed*, 7:1.

Darjanki CM, Rahardjo MB, Diyatri I, Juliastuti WS. 2015. Potensi ekstrak kunyit (*Curcuma longa*) dan lidah buaya (*Aloe vera*) dalam menghambat pembentukan biofilm *Lactobacillus acidophilus*, *Oral Biol J*, 7(1).

Devlin, H., 2006. *Operative dentistry*. Berlin; New York: Springer. p 40.

Ehsani, M., Marashi, M.A., Zabihi, E., Issazadeh, M. and Khafri, S., 2013. A Comparison between Antibacterial Activity of Propolis and Aloe vera on *Enterococcus faecalis* (an in Vitro Study). *IJMCM*, 2(3).

Habibillah, M.F., 2009. Pengaruh variasi konsentrasi dan perbandingan starter bakteri (*Lactobacillus acidophilus*) dan (*Bifidobacterium bifidum*) terhadap kualitas yoghurt susu kambing (*Doctoral dissertation*, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim).

Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. and Stoodley, P., 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*, 2(2):95.

Hilton, T.J., Ferracane, J.L., Mancl, L. and Northwest Practice-based Research Collaborative in Evidence-based Dentistry (NWP), 2013. Comparison of CaOH with MTA for direct pulp capping: a PBRN randomized clinical trial. *J Dent Res*, 92(7\_suppl):16-22.

Hurlow, J., Couch, K., Laforet, K., Bolton, L., Metcalf, D. and Bowler, P., 2015. Clinical biofilms: a challenging frontier in wound care. *Adv Wound Care*, 4(5).

- Jafarei, P. and Ebrahimi, M.T., 2011. *Lactobacillus acidophilus* cell structure and application. *Afr J Microbiol Res*, 5(24):4033-4042.
- Jeon, J.G., Pandit, S., Xiao, J., Gregoire, S., Falsetta, M.L., Klein, M.I. and Koo, H., 2011. Influences of trans-trans farnesol, a membrane-targeting sesquiterpenoid, on *Streptococcus mutans* physiology and survival within mixed-species oral biofilms. *Int J Oral Sci*, 3(2):98-106.
- Kesehatan, K. and RI, K.K., 2013. Riset kesehatan dasar. *Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan Republik Indonesia*. p 114.
- Kidd, E.A.M. and Fejerskov, O., 2004. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res*, 83(1\_suppl):35-38.
- Knight, G.M., McIntyre, J.M., Craig, G.G. and Zilm, P.S., 2008. The inability of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus* to form a biofilm in vitro on dentine pretreated with ozone. *Aust Dent J*, 53(4):349-353.
- Kokare, C.R., Chakraborty, S., Khopade, A.N. and Mahadik, K.R., 2009. Biofilm: importance and applications. *Indian J Biotechnol*. 159-160.
- Leo, LM. 2018. Kombinasi Kalsium Hidroksida-Propolis terhadap Jumlah Kolonisasi *Lactobacillus acidophilus*. Skripsi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya.
- Libério, S.A., Pereira, A.L.A., Araújo, M.J.A., Dutra, R.P., Nascimento, F.R., Monteiro-Neto, V., Ribeiro, M.N.S., Gonçalves, A.G. and Guerra, R.N., 2009. The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on *mutans* group streptococci. *J Ethnopharmacol*, 125(1):1-9.

- Lu, Y., Liu, T., Li, H. and Pi, G., 2008. Histological evaluation of direct pulp capping with a self-etching adhesive and calcium hydroxide on human pulp tissue. *Int Endontic J*, 41(8):643-650.
- Lumley, P. 2006. *Master Dentistry Restorative Dentistry, Paediatric Dentistry, and Orthodontics* (2nd ed.). Philadelphia: Elsevier.
- Mei, M.L., Chu, C.H., Low, K.H., Che, C.M. and Lo, E.C., 2013. Caries arresting effect of silver diamine fluoride on dentine carious lesion with *S. mutans* and *L. acidophilus* dual-species cariogenic biofilm. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 18(6):824.
- Mohammadi Z, Dummer PMH., 2011. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endontic J*, 44:4623-4630.
- Montero J.C, & Mori, G.G. 2012 *Assessment of ion diffusion from a calcium hydroxide-propolis paste throug dentin*. *Braz Oral Res*, 26(4):319-322.
- Mori G.G, da Silva Rodrigues S, Shibayama S.T, Pomini M, & do Amaral C.O.F. 2014. *Biocompatibility of a calcium hydroxide-propolis experimental paste in rat subcutaneous tissue*. *Braz Dent J*, 25(2):104-108.
- Parolia, A., Kundabala, M., Rao, N.N., Acharya, S.R., Agrawal, P., Mohan, M. and Thomas, M., 2010. A comparative histological analysis of human pulp following direct pulp capping with Propolis, mineral trioxide aggregate and Dycal. *Aust Dent J*, 55(1):59-64.
- Pranandaru H, Sembodo A, Choirina J, Wijaya FK, Sewaka SW. 2013. Propolis sebagai suplemen bagi penderita tuberkulosis dewasa. Skripsi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

- Purnomo W & Bramantoro T. 2013. *36 Langkah Praktis Sukses Menulis Karya Tulis Ilmiah*. Revka Petra Media. Surabaya:35-36.
- Putra, A.T.N. 2012. Perbedaan Daya Antibakteri Ekstrak Propolis dan Kalsium Hidroksida Terhadap *Lactobacillus acidophilus*. Skripsi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya.
- Raut, J.S., Shinde, R.B., Chauhan, N.M. and Mohan Karuppaiyl, S., 2013. Terpenoids of plant origin inhibit morphogenesis, adhesion, and biofilm formation by *Candida albicans*. *Biofouling*, 29(1):87-96.
- Regita A. 2018. Degradasi EPS (*Extracellular Polymeric Substance*) Biofilm Bakteri *Lactobacillus achidophilus* Akibat Paparan Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*). Skripsi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya:38-41.
- Salas-Jara, M.J., Ilabaca, A., Vega, M. and García, A., 2016. Biofilm forming *Lactobacillus*: New challenges for the development of probiotics. *Microorganisms*, 4(3), p.35.
- Santoso, M.L., 2012. *Konsentrasi hambat minimum larutan propolis terhadap bakteri Enterococcus faecalis* (Doctoral dissertation, Universitas Airlangga):97.
- Satriya W, Gilang., 2016. Evaluasi Radiografi Keberhasilan Kaping Pulpa Indirek dengan Bahan Kalsium Hidroksida Tipe *Hard Setting* di RSGM UMY (*Doctoral Dissertation*, FKIK UMY).
- Soedjono, P., Mooduto, L., dan Setyowati, L. 2009. *Penutupan apeks pada pengisian saluran akar dengan bahan kalsium oksida lebih baik dibanding kalsium hidroksida*. *Journal PDGI*. 5-8:1-5.

- Suryadinata, A., 2012. Kadar Bikarbonat Saliva Penderita Karies dan Bebas Karies. *Sainstis*:35-36.
- Vollmer, W., Blanot, D. and De Pedro, M.A., 2008. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev*, 32(2):149-167.
- Whitbeck, E., Quinn, G., dan Quinn J., 2011, Effect of Calcium Hydroxide on the Fracture Resistance of Dentin, *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.*, 116:43-49.
- Widjiastuti, I. 2012. Mekanisme Molekuler Stimulasi Ekstrak Propolis pada *Odontoblast Like Cells* yang Dipapar *Lactobacillus acidophilus* Inaktif dalam Menginduksi Diferensiasi Fibroblas Pulpa. Disertasi Thesis Universitas Airlangga Surabaya.
- Widjiastuti, I., Irnatari, N., & Rukmo, M. 2017. Stimulasi Ekstrak Propolis Pada Odontoblast Like Cells yang Diinduksi *Lactobacillus Acidophilus* Inaktif Terhadap Ekspresi Tlr2 dan Tnf $\alpha$ . *ODONTO Dental Journal*, 4(2):86-87.
- Widjiastuti, I., Soetojo, A., & Cahyani, F. 2017. Anti-glucan effects of propolis ethanol extract on *Lactobacillus acidophilus*. *Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)*, 50(1).

LAMPIRAN 1

Keterangan Laik Etik



**UNIVERSITAS AIRLANGGA FACULTY OF DENTAL MEDICINE  
HEALTH RESEARCH ETHICAL CLEARANCE COMMISSION**

**ETHICAL CLEARANCE CERTIFICATE**  
Number : 055/HRECC.FODM/V/2018

Universitas Airlangga Faculty Of Dental Medicine Health Research Ethical Clearance Commission has studied the proposed research design carefully, and therefore, shall herewith certify that the research entitled :

**“HAMBATAN PEMBENTUKAN BIOFILM *Lactobacillus acidophilus* AKIBAT PAPARAN KOMBINASI KALSIMUM HIDROKSIDA-PROPOLIS”**

Principal Researcher : DIDA DEVINA


Unit/Institution/Place of Research : - Lab. Mikro Fakultas Kedokteran  
Universitas Brawijaya Malang

**CERTIFIED TO BE ETHICALLY CLEARED**

 Surabaya, May 23<sup>th</sup>, 2018  
Chairman,  
  
**Prof. Dr. M. Rubianto, drg., MS., Sp.Perio(K)**  
Official No.195009081978021001

LAMPIRAN 2

Analisis Fitokimia Kalsium Hidroksida

**BALAI PENELITIAN DAN KONSULTASI INDUSTRI**  
**LABORATORIUM**  
 **PENELITIAN DAN KONSULTASI INDUSTRI**  
**SURABAYA – JAWA TIMUR**

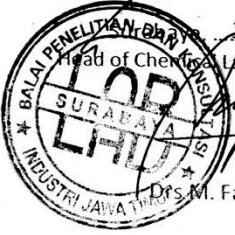
**REPORT**

Certificate of Analysis

No : 07162/KI/V-2018  
Code : Penelitian  
Sample Sender : Mhs.FKG UNAIR Surabaya  
Sample Name : Kalc.Hidroksida  
Test : Hidroksil  
Sample Brand :  
Sample Identity : Padatan putih  
Sample Accepted : 11 Mei 2018

Chemical laboratory test result is :

Kadar Hidroksil , % : 39,20

17 Mei 2018  
Head of Chemical Laboratory Research  
  
Drs. M. Fatoni, M.S.

Laboratory Office Jl. Ketintang Baru XVII no 14  
Telp 08155151337, Bank BCA – Bank Jatim  
Surabaya



LAMPIRAN 3

Analisis Fitokimia Propolis

**BALAI PENELITIAN DAN KONSULTASI INDUSTRI**  
**LABORATORIUM**  
**PENELITIAN DAN KONSULTASI INDUSTRI**  
**SURABAYA – JAWA TIMUR**



**REPORT**

Certificate of Analysis

No : 07161/KI/U-2018  
Code : Penelitian  
Sample Sender : Fhs. FKG UNAIR  
Sample Name : Propolis 8 %  
Test : Bahan aktif  
Sample Brand :  
Sample Identity : Cairan keoklatan  
Sample Accepted : 11 Mei 2018

Chemical laboratory test result is :

1. Flavonoid , % : 0,421  
2. Hidroksil , % : 0,205  
3. Tanin , % : 0,310  
4. Terpenoid , % : 0,324  
5. TF Farnesol , % : 1,63  
6. Thymol, Carvacrol,  
Eugenol , % : 2,84



Surabaya, 15 Mei 2018


Head of Chemical Laboratory Research

*M. Fatoni*  
Drs M. Fatoni, M.S.

Laboratory Office Jl. Ketintang Baru XVII no 14  
Telp 08155151337, Bank BCA – Bank Jatim  
Surabaya

LAMPIRAN 4

Analisis Fitokimia Kombinasi Kalsium Hidroksida-Propolis 1:2

**BALAI PENELITIAN DAN KONSULTASI INDUSTRI**  
**LABORATORIUM**  
 **PENELITIAN DAN KONSULTASI INDUSTRI**  
**SURABAYA – JAWA TIMUR**

**REPORT**

Certificate of Analysis

No : 07163 /KIA/ -2018  
Code : Penelitian  
Sample Sender : Mhs.FKG UNAIR Surabaya  
Sample Name : Propolis 8%-1-2  
Test : Bahan aktif  
Sample Brand :  
Sample Identity : Cairan kental kecoklatan  
Sample Accepted : 11 Mei 2018

Chemical laboratory test result is :

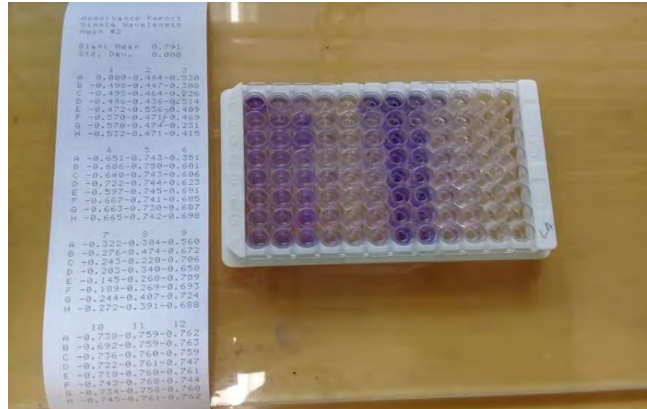
1. Flavonoid , % : 0,220  
2. Hidroksil , % : 0,114  
3. Tanin , % : 0,03  
4. Terpenoid , % : 0,165  
5. IT Farnesol , % : 1,08  
6. Tymol, Carvacrol, % : 1,86  
Eugenol

 Surabaya, 17 Mei 2018  
Head of Chemical Laboratory Research  
  
Drs M. Fatoni, M.S.

Laboratory Office Jl. Ketintang Baru XVII no 14  
Telp 08155151337, Bank BCA – Bank Jatim  
Surabaya

**Lampiran 5**

**Hasil Penelitian**



Replikasi/Kelompok	Kelompok 3 Perbandingan 1:2	Kelompok 4 Kontrol
1	-0.530	-0.651
2	-0.308	-0.686
3	-0.226	-0.640
4	-0.514	-0.722
5	-0.409	-0.597
6	-0.469	-0.667
7	-0.231	-0.663
8	-0.415	-0.665

**Lampiran 6**

**Hasil Analisis Data**

**NPar Tests**

**Descriptive Statistics**

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Perbandingan_1_2	8	.33413	.085097	.220	.474
Kontrol_negatif	8	.72838	.017386	.692	.745

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		Perbandingan_1_2	Kontrol_negatif
N		8	8
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	.33413	.72838
	Std. Deviation	.085097	.017386
Most Extreme Differences	Absolute	.153	.252
	Positive	.153	.169
	Negative	-.123	-.252
Kolmogorov-Smirnov Z		.433	.712
Asymp. Sig. (2-tailed)		.992	.691

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

**T-Test**

**Independent Samples Test**

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means	
		F	Sig.	t	df
Hasil	Equal variances assumed	12.873	.003	-12.839	14
	Equal variances not assumed			-12.839	7.583

**Independent Samples Test**

		t-test for Equality of Means			
		Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference
					Lower
Hasil	Equal variances assumed	.000	-.39425	.03071	-.46011
	Equal variances not assumed	.000	-.39425	.03071	-.46575

**Independent Samples Test**

		t-test for Equality of Means	
		95% Confidence Interval of the Difference	
		Upper	
Hasil	Equal variances assumed	-.32839	
	Equal variances not assumed	-.32275	