

DENTIN
JURNAL KEDOKTERAN GIGI
Vol IV. No 3. Desember 2020

**PENGARUH KITOSAN SISIK IKAN HARUAN (*Channa striata*) TERHADAP
 JUMLAH KOLONI INTERAKSI *Streptococcus sanguinis* DAN *Streptococcus
 mutans* SECARA IN VITRO**

Vena Paramita Djunaidy^{1)*}, Deby Kania Tri Putri^{2)*}, R. Harry Dharmawan Setyawardhana^{3)*}

¹⁾Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Lambung Mangkurat, Banjarmasin

²⁾Departemen Biomedik, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Lambung Mangkurat, Banjarmasin

³⁾Departemen Ilmu Kesehatan Gigi Masyarakat, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Lambung Mangkurat, Banjarmasin

ABSTRACT

Background: *Streptococcus sanguinis* known as a pioneer bacteria of dental plaque formation. It has specific receptor for *Streptococcus mutans* adhesions to attach on tooth surface. *S. mutans* is the important cariogenic bacteria in the pathogenesis of dental caries. The dental caries risk can be prevented with chitosan in haruan fish scales. Chitosan contains an aminopolysaccharide which can inhibit bacterial colonization growth. **Purpose:** To find out effect of chitosan in haruan fish scales (*Channa striata*) to the total colony of interaction *S. sanguinis* and *S. mutans* in vitro. **Methods:** This study used experimental laboratories, post-test with control group design. Chitosan from haruan fish scales were fabricated by deproteination, demineralization, and deacetylation. The effect of chitosan in haruan fish scales test used Standard Plate Count (SPC). **Results:** The lowest average number colonies was shown in chitosan at 5% compared to chitosan at 0,25% and 2,5% concentration. Meanwhile, the highest average number colonies was shown in 1% acetic acid, namely $173,2 \times 10^6$ CFU/mL. **Conclusion:** Chitosan of haruan fish scales (*Channa striata*) at 5% was the most effective concentration to inhibit the colonies growth of *S. sanguinis* and *S. mutans* interaction compared to total colonies at other concentrations, namely 60×10^6 CFU/mL.

Keywords: caries, chitosan, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*

ABSTRAK

Latar Belakang: *Streptococcus sanguinis* dikenal sebagai bakteri pionir pembentukan plak gigi. *S. sanguinis* memiliki reseptor spesifik untuk adhesi *Streptococcus mutans* agar dapat melekat pada permukaan gigi. *S. mutans* merupakan bakteri kariogenik yang penting dalam patogenesis karies gigi. Risiko karies gigi dapat dicegah dengan kitosan sisik ikan haruan. Kitosan mengandung aminopolisakarida yang dapat menghambat pertumbuhan koloni bakteri. **Tujuan:** Untuk mengetahui pengaruh kitosan sisik ikan haruan (*Channa striata*) terhadap pertumbuhan jumlah koloni interaksi *S. sanguinis* dan *S. mutans* secara in vitro. **Metode:** Penelitian ini menggunakan *experimental laboratories* dengan desain *post-test with control group*. Pembuatan kitosan sisik ikan haruan dilakukan dengan deproteinasi, demineralisasi, dan deasetilasi. Uji pengaruh kitosan sisik ikan haruan dilakukan dengan *Standard Plate Count* (SPC). **Hasil:** Rata-rata jumlah koloni paling sedikit ditunjukkan oleh kitosan pada konsentrasi 5% dibandingkan dengan kitosan pada konsentrasi 0,25% dan 2,5%. Sementara itu, rata-rata jumlah koloni paling banyak ditunjukkan pada asam asetat 1%, yaitu $173,2 \times 10^6$ CFU/mL. **Kesimpulan:** Kitosan sisik ikan haruan (*Channa striata*) pada konsentrasi 5% paling efektif dalam menghambat pertumbuhan koloni interaksi *S. sanguinis* dan *S. mutans* dibandingkan dengan jumlah koloni pada konsentrasi lainnya, yaitu 60×10^6 CFU/mL.

Kata kunci: karies, kitosan, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*

Korespondensi: Vena Paramita Djunaidy, Program Studi Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Gigi, Lambung Mangkurat University, Jl. Veteran 128B Banjarmasin, Kalimantan Selatan, e-mail: vena.paramita@gmail.com.

PENDAHULUAN

Karies atau gigi berlubang merupakan masalah utama kesehatan gigi dan mulut yang paling sering dijumpai. Data Riskesdas tahun 2018 menunjukkan bahwa prevalensi penduduk provinsi Kalimantan Selatan yang mengalami masalah kesehatan gigi dan mulut adalah sebesar 60%. Plak gigi memiliki peran yang penting dalam terjadinya karies gigi. Plak gigi merupakan sekumpulan bakteri yang memiliki perlekatan yang kuat di permukaan gigi dengan komponennya yang berisi mikroorganisme dalam matriks interseluler.¹ Mekanisme terbentuknya plak diawali dengan adanya pelikel yang melapisi permukaan gigi. Selanjutnya, diikuti dengan adhesi dari beberapa spesies bakteri pionir seperti *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*). Bakteri *S. sanguinis* memegang peranan dalam pembentukan plak dan perkembangan karies.²

Streptococcus mutans (*S. mutans*) merupakan salah satu bakteri kariogenik yang memegang peranan paling penting. Penelitian Putri (2016) menyebutkan bahwa bakteri *S. mutans* memiliki adhesin yang cocok dengan *S. sanguinis*. Penelitian tersebut juga mengatakan bahwa interaksi antara *S. sanguinis* dan *S. mutans* disebabkan karena *S. sanguinis* memiliki reseptor spesifik yang memfasilitasi adhesi *S. mutans* untuk melekat di permukaan gigi.² Berdasarkan penelitian tersebut, dapat dikatakan bahwa *S. sanguinis* memengaruhi keberadaan *S. mutans*. Pencegahan risiko karies gigi dapat dilakukan dengan cara mencegah *S. mutans* tumbuh secara berlebihan di dalam plak. Lebih lanjut, hal tersebut dapat dilakukan dengan cara interaksi yang terjadi di antara *S. sanguinis* dan *S. mutans* dihambat.³

Dewasa ini penelitian tentang sisik ikan semakin berkembang, hal ini juga didukung oleh Budirahardjo (2010) bahwa sisik ikan dapat dimanfaatkan secara optimal terutama dalam bidang medis.⁴ Sisik ikan jika dilakukan proses demineralisasi, deproteinasi dan deasetilasi akan menghasilkan senyawa turunan kitin yang mempunyai sifat kimia yang lebih baik yaitu kitosan. Kitosan merupakan turunan hasil deasetilasi dari kitin dengan struktur kimia yaitu poli - (1,4)-2-amino-2-dioksi-D-glukosa.⁵

Salah satu bahan alam yang dapat dimanfaatkan untuk mencegah risiko karies gigi adalah kitosan sisik ikan haruan (*Channa striata*). Kitosan sisik ikan haruan dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri karena terjadinya interaksi antara kitosan dengan membran sel terluar dari bakteri.⁶ Penelitian terkait aktivitas antibakteri dari kitosan sisik ikan haruan juga mulai berkembang. Penelitian Widyaningrum

dkk (2019) menunjukkan bahwa salah satu bakteri gram positif yaitu *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) mampu dihambat dengan kitosan sisik ikan haruan pada variasi konsentrasi 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, dan 4%.⁷

Beberapa penelitian sebelumnya telah membuktikan bahwa kitosan sisik ikan haruan selain efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri gram positif juga efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif. Hal ini ditunjukkan pada penelitian terbaru oleh Dania dkk (2020) yang menyebutkan bahwa kitosan sisik ikan haruan mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif yaitu *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*).⁶ Penelitian lain juga dilakukan oleh Aliasghari dkk (2016) yang mengevaluasi efek aktivitas antimikroba kitosan terhadap *Streptococcus oral* salah satunya *S. mutans*. Kitosan dilaporkan mampu menghambat pertumbuhan *S. mutans* pada konsentrasi 0,125% serta konsentrasi yang mampu membunuh bakteri *S. mutans* adalah konsentrasi 0,25%.⁸ Berdasarkan hal tersebut, maka peneliti tertarik untuk melakukan penelitian tentang kitosan sisik ikan haruan pada konsentrasi 0,25%, 2,5%, dan 5% dengan tujuan untuk mengetahui pengaruhnya terhadap jumlah koloni yang terbentuk dari interaksi *S. sanguinis* dan *S. mutans*.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini diawali dengan prosedur kelaikan etik yaitu dengan menyerahkan kepada komisi etik di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Lambung Mangkurat dan telah dinyatakan layak berdasarkan surat nomor etik kelayakan: 084 / KEPKG-FKGULM/ EC / I / 2020. Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian *experimental laboratoris* dengan *posttest with control group design*. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu isolat *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus mutans* ATCC 31987, dan kitosan sisik ikan haruan (*Channa striata*) dengan konsentrasi 0,25%, 2,5%, dan 5%. Kontrol yang digunakan untuk penelitian ini yaitu asam asetat 1% dan kontrol media pertumbuhan yaitu BHI-B yang diinokulasikan ke TYC. Jumlah sampel yang digunakan pada penelitian ini didasarkan pada rumus Federer yang terdiri dari 5 pengulangan pada setiap kelompok perlakuan.

Alat dan Bahan Penelitian

Bahan Penelitian

Bahan untuk pembuatan kitosan sisik ikan haruan terdiri dari sisik ikan haruan, es batu, NaOH 4%, HCl 1% (1N), larutan I2KI 1%,

H₂SO₄ 1 N, NaOH 50%, akuades, dan asam asetat 1%.

Bahan untuk kultur bakteri dan uji *Standard Plate Count (SPC)* terdiri dari isolat murni bakteri *Streptococcus sanguinis* dan *Streptococcus mutans*, *Trypticase Yeast Cysteine (TYC)*, *Brain Heart Infusion Broth (BHI-B)*, asam asetat 1 %, dan NaCl 0,9%.

Bahan untuk pewarnaan gram yaitu kristal violet, lugol's iodine, safranin, dan alkohol 96%.

Alat Penelitian

Alat-alat untuk pembuatan kitosan sisik ikan haruan terdiri dari Erlenmeyer, *beaker glass*, ayakan, *ice box*, blender, *hot plate*, oven, keranjang kecil, toples, aluminium foil neraca analitik, neraca digital, *shaker*, tabung sentrifuge, pH universal.

Alat-alat untuk kultur bakteri dan uji SPC terdiri dari tabung reaksi, kertas label, gelas ukur, erlenmeyer, hot plate, beaker glass, batang pengaduk, sendok bubuk, spirtus, autoclave, masker, handscoon, *vortex mixer*, rak tabung reaksi, *anaerob jar*, *colony counter*, inkubator biasa, spektrofotometer UV-Vis, cawan petri, corong, spatula, ose steril, syringe, *hockey stick spreader*, pipet dan mikropipet.

Pembuatan Kitosan dari Sisik ikan Haruan Pengumpulan Sisik Ikan Haruan

Sisik ikan haruan yang terkumpul dibawa dengan *ice box*, lalu dicuci bersih dari sisa daging dan kotoran yang masih menempel.⁷ Sisik ikan yang sudah dibersihkan selanjutnya ditiriskan dan dikeringkan selama 24 jam dengan suhu 50°C di oven. Setelah melalui proses pengeringan, sisik tersebut diblender sampai menjadi serbuk, diayak, dan disimpan dalam toples yang kedap udara.⁶

Isolasi Kitin

Tahap selanjutnya yaitu isolasi kitin yang didapat melalui proses deproteinisasi dan demineralisasi.

Deproteinisasi

Proses ini dilakukan dengan cara memasukkan serbuk sisik ikan haruan ke dalam gelas ukur. Pada gelas ukur tersebut yang berisi serbuk sisik ikan haruan tersebut ditambahkan natrium hidroksida (NaOH 4%) dan direbus pada suhu 80°C selama 1 jam. Langkah selanjutnya dilakukan dengan mendinginkan gelas ukur tersebut pada suhu kamar dan didiamkan selama 30 menit. Setelah gelas ukur mencapai suhu kamar, sampel dibilas dengan menggunakan akuades hingga didapatkan pH netral. Sampel yang telah mencapai pH netral dimasukkan ke

dalam oven selama 24 jam dengan suhu 50°C untuk dikeringkan.⁶

Demineralisasi

Proses ini dilakukan dengan cara menambahkan 1% HCl pada sampel di dalam gelas ukur dengan perbandingan sampel dan HCl adalah 1:4. Lama waktu perendaman dilakukan selama 24 jam. Tahap berikutnya dilakukan dengan membilas sampel dengan akuades steril hingga didapatkan pH netral. Setelah sampel mencapai pH netral, selanjutnya sampel dikeringkan dengan suhu 50°C selama 24 jam di dalam oven.⁶

Uji Kitin

Uji kitin dilakukan dengan menggunakan reaksi warna Van Wesslink dengan cara mereaksikan kitin dengan larutan I₂-KI 1%, sehingga menghasilkan warna kuning kecokelatan. Proses ini dilanjutkan dengan menambahkan H₂SO₄ 1 M, sehingga dengan adanya penambahan tersebut akan menyebabkan perubahan warna menjadi merah keunguan atau red violet. Perubahan warna tersebut menjadi indikator reaksi positif adanya kitin.⁷

Pembuatan Kitosan

Deasetilasi

Proses ini dilakukan dengan cara serbuk sisik ikan haruan ditambahkan 50% NaOH dan direbus di *hot plate* dengan suhu 80°C selama 2 jam. Sampel tersebut selanjutnya didinginkan pada suhu ruang selama 30 menit. Tahap berikutnya dilakukan dengan mencuci sampel menggunakan akuades steril berulang kali hingga mencapai pH netral. Sampel yang telah mencapai pH netral disaring terlebih dahulu dan dilanjutkan dengan proses mengeringkan sampel menggunakan oven dengan suhu 50°C selama 24 jam. Kitosan yang diperoleh berwarna putih krem dalam bentuk serbuk.⁶

Metode Pengujian Antibakteri

Pengumpulan sampel

Isolat *S. sanguinis* dan *S. mutans* masing-masing diinokulasikan ke dalam media TYC selama 24 jam dengan suhu 37°C.³

Pembuatan media selektif

Media selektif TYC dibuat dengan memasukkan 100 gram TYC di dalam akuades steril sebanyak 1000 mL. Proses ini dilanjutkan dengan cara menghomogenkan dan memanaskan media di atas *hot plate*. Media TYC tersebut selanjutnya dilakukan sterilisasi selama 15 menit pada suhu 121°C dengan menggunakan autoklaf.⁹

Pewarnaan Gram

Prosedur pewarnaan gram diawali dengan cara koloni bakteri diambil sebanyak 1-2 ose, diolesi di atas kaca preparat, dan difiksasi di atas bunsen. Tahap pertama pemberian zat warna yaitu meneteskan kristal violet pada kaca preparat, ditunggu selama 3 menit, lalu dibilas menggunakan air. Tahap kedua dilakukan dengan meneteskan larutan lugol di atas kaca preparat tersebut, ditunggu selama 1 menit, lalu dibilas kembali dengan air. Tahap ketiga dilakukan dengan meneteskan kembali alkohol 96% pada kaca preparat selama 10 detik sampai zat warna tersebut menghilang, lalu bilas kembali dengan air. Tahap terakhir yaitu meneteskan safranin pada kaca preparat tersebut, ditunggu selama 2 menit, dan dibilas kembali menggunakan air hingga kaca preparat kering. Setelah preparat mengering, selanjutnya dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop cahaya dengan tujuan untuk mengidentifikasi morfologi dan warna bakteri. Bakteri dengan jenis Gram positif menampilkan warna ungu.⁹

Prosedur pengenceran sampel

Sampel *S. sanguinis* dan *S. mutans* dibuat suspensi yang berisi pengencer NaCl 0,9% dengan perbandingan 1:4. Proses ini dilanjutkan dengan mengukur kepekatan suspensi menggunakan spektrofotometer UV-Vis 625 nm dengan nilai absorbansi sebesar 0,08-0,10. Tahap berikutnya yaitu isolat bakteri *S. sanguinis* dan *S. mutans* diinteraksikan dalam BHI-B dan dilakukan pengenceran *serial dilution*. Metode *serial dilution* dilakukan dengan cara menyiapkan 5 tabung reaksi yang sudah diisi 9 ml NaCl 0,9%. Pada tabung yang sudah diukur dengan spektrofotometer dilakukan pengambilan sampel sebanyak 1 mL dengan mikropipet dan dilakukan pemindahan ke dalam tabung pengenceran ke-1 yang sudah diisi 9 ml NaCl 0,9%, lalu dihomogenkan. Pada tabung pertama tersebut, lakukan kembali pengambilan sampel dan dipindahkan sebanyak 1 mL ke dalam tabung pengenceran ke-2 yang sudah diisi 9 ml NaCl 0,9%, lalu dihomogenkan kembali. Proses dilanjutkan dengan cara yang sama seperti sebelumnya yaitu dengan cara dipindahkan hingga tabung pengenceran terakhir¹⁰

Kultur mikroorganisme

Kultur dilakukan dengan mengambil suspensi cairan sebanyak 0,1 ml dengan mikropipet pada tabung tingkat pengenceran 10^{-5} hingga tingkat pengenceran 10^{-1} . Pengkulturan dilanjutkan dengan meneteskan suspensi pada

permukaan media agar yang telah padat. Pengamatan dilakukan selama 24 jam dengan cara

menghitung koloni *S. mutans* dan *S. sanguinis* yang tumbuh pada media TYC menggunakan *colony counter*. Tabung yang mengandung jumlah koloni sebanyak 30-300 koloni merupakan tabung yang dipilih.¹⁰

Prosedur penelitian ini dilanjutkan dengan mempersiapkan tabung reaksi sebanyak 5 buah dan setiap tabung tersebut ditempel kertas label untuk memberikan keterangan konsentrasi yang digunakan. Pada tabung 1 diisi BHI-B dan diinokulasikan ke dalam media agar TYC (kontrol media pertumbuhan), tabung 2 diisi asam asetat 1%, (kelompok kontrol), tabung 3 diisi kitosan dengan konsentrasi 0,25%, tabung 4 diisi kitosan dengan konsentrasi 2,5%, dan tabung 5 diisi kitosan dengan konsentrasi 5%. Setiap tabung tersebut dilakukan pengisian sebanyak 3,5 mL. Proses ini dilanjutkan dengan menambahkan 1 mL BHI-B dan 0,5 mL suspensi bakteri *S. sanguinis* dan *S. mutans* pada tabung ke-2 hingga tabung ke-5.

Langkah selanjutnya yaitu mengambil 0,1 ml suspensi pada setiap tabung dengan mikropipet dan teteskan pada media TYC untuk ditanam dengan metode *spread plate*. Suspensi tersebut diratakan menggunakan batang L. Pengkulturan ini dilanjutkan dengan cara memasukkan media ke dalam inkubator dengan keadaan anaerob dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37 °C. Setelah proses pengkulturan, pertumbuhan koloni diamati dan dilakukan perhitungan jumlah koloni dengan menggunakan *colony counter*.³

HASIL

Hasil Kultur dan Identifikasi Bakteri *Streptococcus mutans* dan *Streptococcus sanguinis*

Kultur bakteri dilakukan pada TYC dan diinkubasi dalam kondisi anaerob dengan suhu 37°C selama 24 jam. Hasil kultur bakteri *Streptococcus sanguinis* pada media agar TYC menunjukkan koloni bakteri berwarna putih mengkilap seperti pada Gambar 1. Sedangkan, hasil kultur bakteri *Streptococcus mutans* menunjukkan koloni bakteri berwarna putih kekuningan seperti pada Gambar 2. Pada Gambar 3 menunjukkan hasil kultur *S. sanguinis* dan *S. mutans* yang dikultur secara bersama menampilkan koloni bakteri berwarna kuning pucat.



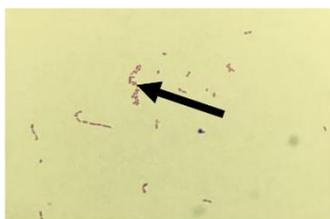
Gambar 1. Kultur *S. sanguinis* pada media agar TYC setelah inkubasi 24 jam



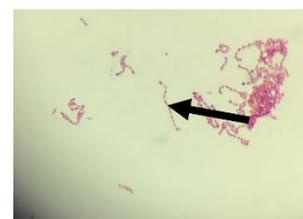
Gambar 2. Kultur *S. sanguinis* pada media agar TYC setelah inkubasi 24 jam



Gambar 3 Kultur bersama *S. sanguinis* dan *S. mutans* pada media agar TYC setelah inkubasi 24 jam



Gambar 4. Hasil Pewarnaan Gram Koloni *S. sanguinis*



Gambar 5. Hasil Pewarnaan Gram Koloni *S. mutans*

Nilai Absorbansi Suspensi Bakteri *Streptococcus sanguinis* dan *Streptococcus mutans*

Proses penghitungan kadar kekeruhan suspensi bakteri *Streptococcus sanguinis* dan *Streptococcus mutans* masing-masing dilakukan dengan spektrofotometer UV-Vis (625 nm, nilai absorbansi 0,08 – 0,10). Nilai absorbansi yang didapat pada setiap suspensi ditunjukkan melalui tabel 1.

Tabel 1. Nilai Absorbansi Suspensi Bakteri *Streptococcus sanguinis* dan *Streptococcus mutans*.

Suspensi Bakteri	Nilai Absorbansi
<i>Streptococcus sanguinis</i>	0,082
<i>Streptococcus mutans</i>	0,091

Tabel 1 Menunjukkan nilai absorbansi pada suspensi bakteri *S. sanguinis* sebesar 0,082 dan nilai absorbansi pada suspensi *S. mutans* sebesar 0,091.

Jumlah Koloni Interaksi *Streptococcus sanguinis* dan *Streptococcus mutans* Hasil Pengenceran Bertingkat

Hasil pengenceran bertingkat yang dilakukan pada suspensi koloni interaksi *S. sanguinis* dan *S. mutans* pada tingkat pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ditunjukkan melalui Tabel 2.

Tabel 2. Data Hasil Jumlah Koloni Interaksi *Streptococcus sanguinis* dan *Streptococcus mutans* Hasil

Tingkat Pengenceran	Jumlah Pertumbuhan Koloni (CFU/ cawan)
10^{-1}	TBUD
10^{-2}	TBUD
10^{-3}	TBUD
10^{-4}	TBUD
10^{-5}	251

Pengenceran Bertingkat

Keterangan: TBUD = Terlalu Banyak Untuk Dihitung

Tabel 2 menunjukkan bahwa tingkat pengenceran 10^{-1} – 10^{-4} tidak dilakukan analisis data sebab jumlah koloni tiap sampel melebihi batas maksimum dari standar perhitungan yaitu lebih dari 300 koloni.¹¹ Jumlah koloni pada sampel dengan lebih dari 300 koloni dilaporkan sebagai TBUD (Terlalu Banyak untuk Dihitung) .¹² Berdasarkan hal tersebut, maka pengenceran 10^{-5} termasuk dalam standar perhitungan koloni yaitu 30-300 koloni, sehingga pengujian sampel dengan *Standard Plate Count (SPC)* pada penelitian ini menggunakan pengenceran 10^{-5} .

Uji Pengaruh Kitosan Sisik Ikan Haruan (*Channa striata*) terhadap Jumlah Koloni Interaksi *Streptococcus sanguinis* dan *Streptococcus mutans* dengan *Standard Plate Count (SPC)*

Uji pengaruh kitosan sisik ikan haruan (*Channa striata*) terhadap jumlah koloni interaksi *S. sanguinis* dan *S. mutans* dengan SPC ditunjukkan melalui tabel 3.

Tabel 3. Uji Pengaruh Kitosan Sisik Ikan Haruan (*Channa striata*) terhadap Jumlah Koloni Interaksi *Streptococcus sanguinis* dan *Streptococcus mutans* dengan *Standard Plate Count (SPC)*.

Konsentrasi Bahan Uji	Jumlah Koloni (CFU/mL)					Rata-rata Jumlah Koloni Interaksi <i>S. sanguinis</i> dan <i>S. mutans</i> (CFU/mL)
	P1	P2	P3	P4	P5	
KSH 0,25%	101 x 10 ⁶	106 x 10 ⁶	102 x 10 ⁶	112 x 10 ⁶	107 x 10 ⁶	105,6 x 10 ⁶
KSH 2,5%	89 x 10 ⁶	82 x 10 ⁶	85 x 10 ⁶	80 x 10 ⁶	88 x 10 ⁶	84,8 x 10 ⁶
KSH 5%	62 x 10 ⁶	59 x 10 ⁶	58 x 10 ⁶	61 x 10 ⁶	60 x 10 ⁶	60 x 10 ⁶
As.Asetat 1%	176 x 10 ⁶	179 x 10 ⁶	174 x 10 ⁶	166 x 10 ⁶	171 x 10 ⁶	173,2 x 10 ⁶
BHI-B+ TYC	0	0	0	0	0	0

Keterangan:

P1 : Pengulangan pertama

P2 : Pengulangan kedua

P3 : Pengulangan ketiga

P4 : Pengulangan keempat

P5 : Pengulangan kelima

KSH 0,25% : Kitosan Sisik Ikan Haruan 0,25%

KSH 2,5% : Kitosan Sisik Ikan Haruan 2,5%

KSH 5% : Kitosan Sisik Ikan Haruan 5%

As.Asetat 1% : Asam Asetat 1%

BHI-B + TYC : *Brain Heart Infusion-Broth* + *Tryptone Yeast Cysteine*

Berdasarkan tabel 3 menunjukkan nilai rata-rata jumlah perhitungan koloni interaksi *S. sanguinis* dan *S. mutans*. Uji tersebut dilakukan di media TYC pada setiap kelompok perlakuan sebanyak lima kali pengulangan. Rata-rata jumlah koloni interaksi *S. sanguinis* dan *S. mutans* setelah dilakukan pembagian dengan pengenceran 10⁻⁵ pada konsentrasi 0,25% adalah 105,6 x 10⁶ CFU/mL, konsentrasi 2,5% adalah 84,8 x 10⁶ CFU/mL, konsentrasi 5% adalah 60 x 10⁶ CFU/mL. Hasil rata-rata jumlah koloni interaksi *S. sanguinis* dan *S. mutans* pada kelompok kontrol asam asetat 1% adalah 173,2 x 10⁶ CFU/mL, sedangkan pada kontrol media pertumbuhan (BHI-B + TYC) adalah 0 CFU/mL.

Hasil analisis data pada penelitian ini didapatkan distribusi data normal, dengan nilai p >

0,05, sedangkan untuk varians data pada penelitian ini tidak sama, dengan nilai p = 0,02 (p < 0,05). Berdasarkan hasil analisis statistik tersebut, maka uji statistik yang digunakan pada penelitian ini yaitu uji non-parametrik *Kruskal-Wallis*.

Hasil analisis statistik dengan uji *Kruskal-Wallis* menunjukkan nilai p = 0,000 (p < 0,05). Nilai tersebut memiliki arti bahwa H₀ ditolak yaitu terdapat perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan terhadap jumlah koloni interaksi *S. sanguinis* dan *S. mutans*. Berdasarkan hal tersebut, dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh kitosan sisik ikan haruan (*Channa striata*) terhadap jumlah koloni interaksi *S. sanguinis* dan *S. mutans* secara in vitro. Uji statistik *Kruskal-Wallis* yang memiliki nilai p < 0,05 dapat dilakukan analisis lanjutan yaitu *post hoc Mann-Whitney*.

Tabel 4. Hasil Uji Lanjut *Mann-Whitney* Pengaruh Kitosan Sisik Ikan Haruan (*Channa striata*) terhadap Jumlah Koloni Interaksi *S. sanguinis* dan *S. mutans* Secara In Vitro.

Kelompok Perlakuan	KSH 0,25%	KSH 2,5%	KSH 5%	As.asetat 1%	BHI-B + TYC	
KSH 0,25%	-	0,009*	0,009*	0,009*	0,005*	
KSH 2,5%	0,009*	-	0,009*	0,009*	0,005*	
KSH 5%	0,009*	0,009*	-	0,009*	0,005*	
As.asetat 1%	0,009*	0,009*	0,009*	-	0,005*	
BHI-B + TYC	0,005*	0,005*	0,005*	0,005*	-	
Keterangan:	*	=	p<0,05,	terdapat	perbedaan	bermakna

Tabel 4 Hasil uji *Mann-Whitney* menunjukkan bahwa jumlah koloni interaksi *S. sanguinis* dan *S. mutans* memiliki perbedaan bermakna terhadap semua kelompok perlakuan antara kelompok perlakuan.

PEMBAHASAN

Penelitian ini diawali dengan pengkulturan pada masing-masing bakteri *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*) dan *Streptococcus mutans* (*S. mutans*). Pada penelitian ini, pengkulturan dilakukan pada masing-masing bakteri di media agar TYC. Hasil pengkulturan *S. sanguinis* pada media agar TYC menampilkan warna koloni putih mengkilap dengan permukaan yang cembung. Hal ini sesuai dengan Patidar dkk (2018) yang menyebutkan morfologi koloni *S. sanguinis* memberikan gambaran halus atau kasar, keras, memiliki konsistensi yang kenyal, dengan warna abu-abu, putih, atau tidak berwarna yang melekat kuat pada media agar.¹³

Pada penelitian ini juga dilakukan pengkulturan *S. mutans* pada media agar TYC memberikan tampilan warna koloni putih kekuningan dengan permukaan yang cembung. Hal ini sesuai dengan Marwaha dan Bhat (2011) yang menyebutkan bahwa morfologi koloni *S. mutans* memberikan gambaran sebagai tumpukan kuning kasar, tidak teratur, berwarna abu atau kuning dengan penampilan seperti kaca putih, berdiameter 0,5 sampai 2 mm.¹⁴ Setelah prosedur pengkulturan pada masing-masing bakteri, tahap penelitian ini dilanjutkan dengan konfirmasi bakteri melalui pewarnaan Gram.

Hasil identifikasi pewarnaan Gram pada masing-masing bakteri *S. sanguinis* dan *S. mutans* pada penelitian ini menunjukkan warna keunguan dengan morfologi bakteri berbentuk coccus berantai. Warna ungu yang dihasilkan dari hasil pewarnaan Gram menunjukkan bahwa bakteri *S. sanguinis* dan *S. mutans* termasuk ke dalam jenis bakteri Gram positif. Bakteri gram positif mempunyai struktural dinding sel yang lebih sederhana dengan lapisan peptidoglikan yang lebih tebal yaitu 40 lapisan sehingga bakteri Gram positif mampu mempertahankan zat warna metil ungu dari Kristal violet.¹⁵

Melalui penelitian ini, juga dilakukan pengkulturan bersama *S. sanguinis* dan *S. mutans* pada media TYC dan didapatkan hasil kultur dengan koloni berwarna kuning pucat. Pada hasil kultur yang diamati secara visual tersebut, maka peneliti menyimpulkan bahwa pertumbuhan yang lebih pesat adalah *S. mutans*. Hal ini sesuai dengan Putri (2016) yang menyebutkan bahwa *S. sanguinis* merupakan bakteri pionir yang mampu memfasilitasi bakteri-bakteri lainnya termasuk

bakteri kariogenik yaitu *S. mutans*.² *S. mutans* dapat berperan sebagai bakteri pionir maupun bakteri sekunder. Selain itu, *S. mutans* mampu bertahan lebih lama pada berbagai lingkungan terkhususnya lingkungan asam. Hal ini didasarkan pada kemampuan *S. mutans* dengan sifatnya asidurik dan asidofilik sehingga *S. mutans* lebih mudah memiliki kesempatan untuk bermetabolisme dan membentuk koloni lebih cepat.¹⁶

Berdasarkan hasil kultur bersama tersebut juga diasumsikan telah terjadi interaksi antara *S. sanguinis* dan *S. mutans*. Hal ini didukung oleh penelitian Putri dkk (2016) yang menyebutkan bahwa interaksi *S. sanguinis* dan *S. mutans* disebabkan karena bakteri *S. sanguinis* memiliki reseptor spesifik untuk memfasilitasi adhesi *S. mutans* agar dapat melekat pada permukaan gigi. Lebih lanjut, penelitian Putri dkk (2016) menyebutkan bahwa biofilm *S. mutans* memiliki kemampuan untuk mengenali epitop spesifik dari konstituen protein dalam biofilm *S. sanguinis*.² Menurut Zhu dkk (2018) apabila kedua bakteri *S. sanguinis* dan *S. mutans* diinokulasikan secara bersama dalam waktu yang sama pada media agar maka kedua bakteri tersebut akan saling berkoeksistensi.¹⁷

Pada penelitian ini, pengaruh aktivitas antibakteri kitosan sisik ikan haruan terhadap jumlah koloni interaksi *S. sanguinis* dan *S. mutans* dilakukan dengan metode *serial dilution*. Tujuan *serial dilution* adalah untuk mengurangi jumlah mikroba yang tersuspensi dalam cairan.¹⁸ Penghitungan jumlah koloni interaksi *S. sanguinis* dan *S. mutans* didasarkan pada metode *Standard Plate Count* (SPC) Metode SPC yaitu memilih cawan yang ditumbuhi koloni pada metode *Total Plate Count* (TPC) dengan syarat 30-300 koloni/cawan.¹¹ Pemilihan cawan yang mengandung 30-300 koloni dimaksudkan agar persyaratan statistik terpenuhi, karena apabila cawan mengandung jumlah koloni yang melebihi ambang batas maksimum (> 300 koloni) maka kemungkinan terjadi kesalahan perhitungan akan semakin besar sedangkan pada jumlah koloni yang terlalu sedikit (< 30 koloni) akan tidak sah dihitung karena kurang teliti secara statistik.¹¹

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kitosan sisik ikan haruan dengan konsentrasi 0,25% , 2,5% , dan 5% terbukti dapat menghambat pertumbuhan jumlah koloni interaksi bakteri *S. sanguinis* dan *S. mutans*. Hal tersebut ditandai dengan menurunnya pertumbuhan jumlah koloni interaksi *S. sanguinis* dan *S. mutans* pada tiap konsentrasi perlakuan apabila dilakukan perbandingan dengan asam asetat 1%. Nilai rata-rata jumlah koloni interaksi *S. sanguinis* dan *S. mutans* yang

tumbuh secara berurutan pada kitosan sisik ikan haruan konsentrasi 0,25%, 2,5%, 5%, kontrol asam asetat 1%, dan kontrol media pertumbuhan (BHI-B+TYC) yaitu $105,6 \times 10^6$ CFU/mL, $84,8 \times 10^6$ CFU/mL, 60×10^6 CFU/mL, $173,2 \times 10^6$ CFU/mL, dan 0 CFU/mL.

Berdasarkan hasil penelitian di atas, kitosan sisik ikan haruan memiliki daya hambat bagi pertumbuhan koloni interaksi *S. sanguinis* dan *S. mutans*. Hal ini disebabkan kitosan sisik ikan haruan memiliki potensi sebagai antibakteri. Hal ini sejalan dengan penelitian oleh Putri (2020) yang menyebutkan bahwa derajat deasetilisasi (DD) kitosan sisik ikan haruan yang melalui proses deasetilisasi dengan NaOH 50% pada suhu 80°C dilaporkan memiliki DD sebesar 85,25%. DD tersebut menunjukkan nilai yang lebih tinggi daripada SNI kitosan yaitu ≥ 75 . DD berhubungan dengan terbentuknya jumlah gugus amina (-NH₂) bermuatan positif. Semakin tinggi DD maka semakin tinggi gugus asetil yang dihilangkan dan digantikan dengan gugus amina (-NH₂).¹⁹ Banyaknya gugus amina yang terbentuk pada kitosan mempengaruhi banyaknya aktivitas antimikroba yang dihasilkan. Semakin banyak gugus amina maka semakin banyak juga aktivitas antimikroba yang dihasilkan. Hal ini terbukti pada hasil penelitian Widyaningrum dkk (2019) dan Dania dkk (2020) yang meneliti aktivitas kitosan sisik ikan haruan terhadap bakteri gram positif rongga mulut lainnya yaitu *Staphylococcus aureus* dan bakteri gram negatif *Porphyromonas gingivalis*.^{6,7} Berdasarkan hasil penelitian tersebut, dapat diketahui bahwa kitosan sisik ikan haruan efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri gram positif maupun gram negatif.

Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa setiap konsentrasi kitosan sisik ikan haruan memiliki kemampuan daya hambat yang berbeda terhadap pertumbuhan jumlah koloni interaksi *S. sanguinis* dan *S. mutans*. Berdasarkan data penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi 5% memiliki kemampuan daya hambat yang paling efektif. Hal ini ditandai dengan jumlah koloni yang terbentuk pada konsentrasi 5% lebih sedikit jika dibandingkan dengan jumlah koloni pada konsentrasi lainnya yaitu 60×10^6 CFU/mL. Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini sejalan dengan Costa dkk (2013) dan Aliasghari dkk (2016) dalam Dania dkk (2020) yang menyebutkan bahwa semakin tinggi kadar konsentrasi kitosan, semakin tinggi pula kemampuannya dalam menghambat dan membunuh bakteri. Besarnya tingkat konsentrasi kitosan akan mempengaruhi banyaknya jumlah muatan positif gugus amina -NH₂ yang dapat

berikatan dengan muatan negatif permukaan sel bakteri.⁶ Mekanisme kitosan sebagai antibakteri dapat dijelaskan melalui interaksi polikationik kitosan dengan komponen anionik sel bakteri yang terdapat pada dinding sel. Pada interaksi tersebut terjadi gaya elektostatik akibat gugus fungsional amina pada kitosan yang memiliki pasangan elektron bebas. Hal tersebut menyebabkan kitosan mampu menarik kandungan Mg^{2+} pada ribosom dan Ca^{2+} pada dinding sel mikroba. Proses ini berlanjut dengan terjadinya perubahan permeabilitas membran sehingga memicu ketidakseimbangan tekanan osmotik internal. Peristiwa tersebut menyebabkan peptidoglikan pada dinding bakteri mengalami hidrolisis dan terjadi kebocoran konstituen intraseluler. Kebocoran konstituen intraseluler dapat menyebabkan bakteri menjadi lisis.²⁰

Penelitian ini menggunakan dua jenis kontrol yaitu kontrol asam asetat 1% dan kontrol media pertumbuhan yaitu BHI-B yang diinokulasikan ke TYC. Asam asetat 1% merupakan pelarut kitosan yang dapat memberikan daya hambat terhadap bakteri.²¹ Pada penelitian ini, berdasarkan data hasil pengukuran jumlah koloni interaksi *S. sanguinis* dan *S. mutans* menunjukkan kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri pada kitosan lebih baik dibandingkan dengan kontrol asam asetat 1%.

Pada penelitian ini juga menggunakan kontrol media pertumbuhan yaitu BHI-B yang diinokulasikan ke dalam TYC tanpa perlakuan apapun. Kontrol media pertumbuhan ini memiliki fungsi untuk memastikan bahwa jumlah koloni yang akan dihitung memang benar adalah jumlah koloni interaksi antara *S. sanguinis* dan *S. mutans*. Pada pembuatan kontrol media pertumbuhan dilakukan uji sterilitas untuk memastikan agar tidak terjadi kontaminasi mikroba. Pada penelitian ini menggunakan kontrol media pertumbuhan yang tidak mengalami kontaminasi. Hal tersebut ditandai dengan tidak adanya jumlah koloni bakteri yang terbentuk yaitu 0 CFU/mL.

Berdasarkan hasil statistik *Kruskal-Wallis* dengan nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$) menunjukkan kitosan sisik ikan haruan memiliki perbedaan bermakna terhadap pertumbuhan jumlah koloni interaksi bakteri *S. sanguinis* dan *S. mutans*. Hal ini juga sejalan dengan hipotesis penelitian ini bahwa kitosan sisik ikan haruan memiliki pengaruh terhadap jumlah koloni interaksi bakteri *S. sanguinis* dan *S. mutans*. Adanya pengaruh tersebut terjadi karena terdapat aktivitas antibakteri pada kitosan sisik ikan haruan.

Hasil uji post hoc *Mann-Whitney* menunjukkan bahwa jumlah koloni interaksi bakteri *S. sanguinis* dan *S. mutans* memiliki

KESIMPULAN

Kitosan sisik ikan haruan (*Channa striata*) pada konsentrasi 5% paling efektif dalam menghambat pertumbuhan koloni interaksi *S. sanguinis* dan *S. mutans* dibandingkan dengan jumlah koloni pada konsentrasi lainnya yaitu 60 x 10 CFU/ mL.

DAFTAR PUSTAKA

- Ladytama RS, Nurhapsari A, Baehaqi M. Efektivitas Larutan Ekstrak Jeruk Nipis (*Citrus Aurantifolia*) Sebagai Obat Kumur Terhadap Penurunan Indeks Plak Pada Remaja Usia 12 – 15 Tahun - Studi Di Smp Nurul Islami, Mijen, Semarang. *ODONTO Dental Journal*. 2014; 1(1): 39-43.
- Putri DKT, Kriswandini IL, Luthfi M. Characterization of *Streptococcus sanguis* molecular receptors for *Streptococcus mutans* binding molecules. *Dental Journal Majalah Kedokteran Gigi*. 2016; 49(4): 213-216.
- Andayani R, Chismirina S, Kumalasari I. Pengaruh Ekstrak Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi*) Terhadap Interaksi *Streptococcus sanguinis* dan *Streptococcus mutans* Secara In Vitro. *Cakradonya Dental Journal*. 2014; 6(2): 727-731.
- Budirahardjo R. Sisik Ikan Sebagai Bahan Yang Berpotensi Mempercepat Proses Penyembuhan Jaringan Lunak Rongga Mulut, Regenerasi Dentin Tulang Alveolar. *Stomatognatic Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Jember*. 2010; 7(2): 136-140.
- Zaeni M, Safitri E, Suidiana IN. Pembuatan Glukosamin Hidroklorida dari Cangkang Udang dengan Energi Microwave. *Jurnal Aplikasi Fisika*. 2017; 13(1): 22-26.
- Widyaningrum DRW, Putri DKT, Taufiqurrahman I. Antibacterial Activities Of Chitosan In Haruan Fish Scales (*Channa striata*) To The Growth Of *Staphylococcus Aureus*. *Dentino Jurnal Kedokteran Gigi*. 2019; 4(2): 162-167.
- Dania RAJ, Putri DKT, Taufiqurrahman I. Antibacterial Activity Of Chitosan From Haruan (*Channa striata*) Fish Scales Against The Growth Of *Porphyromonas Gingivalis*. *Dentino Jurnal Kedokteran Gigi*. 2020; 5(1): 53-57.
- Aliasghari A, Khorasgani MR, Vaezifar S, Rahimi F, Younesi H, Khoroushi M. Evaluation Of Antibacterial Efficiency Of Chitosan and Chitosan Nanoparticles On Cariogenic *Streptococci*: An In Vitro Study. *Iran J Microbiol*. 2016; 8(2): 93-100.
- perbedaan bermakna terhadap semua kelompok perlakuan. Hal ini ditunjukkan dengan nilai $p < 0,05$.
- Andayani R, Nasution AI, Qadri M. Perbandingan Jumlah Koloni *Streptococcus sp*, *Lactobacillus sp* dan *Candida sp* Di Dalam Rongga Mulut Pasien Skizofrenia Rumah Sakit Jiwa Banda Aceh. *Cakradonya Dental Journal*. 2014; 6(1): 619-677.
- Mubarak Z, Chismirina S, Daulay HH. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Propolis Alami dari Sarang Lebah Terhadap Pertumbuhan *Enterococcus Faecalis*. *Jurnal Syiah Kuala Dentistry*. 2016; 1(2): 175-186.
- Sundari S dan Fadhlani. Uji Angka Lempeng Total (ALT) pada Sediaan Kosmetik Lotion X di BBPOM Medan. *Biologica Samudera*. 2019; 1(1): 25-33.
- Sukmawati dan Hardianti F. Analisis Total Plate Count (TPC) Mikroba Pada Ikan Asin Kakap di Kota Sorong Papua Barat. *Jurnal Biodjati*. 2018; 3(1): 72-78.
- Patidar D, Sogi S, Singh V, Shinu P, Loomba A, Patidar DC. Salivary levels of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in Early Childhood Caries: An In vivo Study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2018; 36(4): 386-390.
- Marwaha M dan Bhat M. Evaluation of the Antimicrobial Effectiveness and the Effect of Dosage and Frequency of Sugar-free Chewing Gums on *Streptococcus mutans* Count: An in vivo Microbiological Study. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2011; 4(1): 29-34.
- Putri MH, Sukini, Yodong. *Bahan Ajar Keperawatan Gigi Mikrobiologi*. Jakarta: PPSDMK Kementerian Kesehatan Republik Indonesia; 2017: 27-28.
- Satari MH dan Malida Y. Perbedaan Jumlah Koloni *Streptococcus mutans* pada perokok kretek dan bukan perokok. *Jurnal Kedokteran Gigi Unpad*. 2018; 30(2): 96-102.
- Zhu B, Macleod LC, Kitten T, Xu P. *Streptococcus sanguinis* Biofilm Formation and Interaction with Oral Pathogens. *Future Microbiol*. 2018; 13(8): 915-932.
- Yunita M, Hendrawan Y, Yulianingsih R. Analisis Kuantitatif Mikrobiologi pada Makanan Penerbangan (Aerofood ACS) Garuda Indonesia Berdasarkan TPC (Total Plate Count) dengan Metode Pour Plate. *JKPTB*. 2015; 3(3): 237-248.
- Putri DKT, Diah W, Oktiani BW, Candra, Sukmana BI, Rachmadi P, dkk. Synthesis and Characteristics of Chitosan from Haruan (*Channa striata*) Fish Scales. *Systematic Reviews In Pharmacy*. 2020; 11(4): 15-20.

20. Wittriansyah K, Soedihono, Satriawan D. Aplikasi Kitosan *Emerita sp.* Sebagai Bahan Pengawet Alternatif pada Ikan Belanak (*Mugil cephalus*). *JIPK*. 2019; 11(1): 34-42.
21. Damayanti W, Rochima E, Hasan Z .Aplikasi Kitosan Sebagai Antibakteri Pada Filet Patin Selama Penyimpanan Suhu Rendah. *JPHPI*. 2016; 19(3): 321-328.