



UNIVERSITAS INDONESIA

DAYA ANTIMIKROBA AIR BEROZONE, KLOORHEKSIDIN
DAN NATRIUM HIPOKLORIT TERHADAP
ENTEROCOCCUS FAECALIS (IN VITRO)

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Spesialis dalam bidang Ilmu Konservasi Gigi

STANNY LINDA PAATH
0706196020

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER GIGI SPESIALIS
ILMU KONSERVASI GIGI
JAKARTA
JULI 2010

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.**

Nama : Stanny Linda Paath
NPM : 0706196020

Tanda tangan : 
Tanggal : 8 Juli 2010

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :
Nama : Stanny Linda Paath
NPM : 0706196020
Program Studi : Konservasi Gigi
Judul Tesis : Daya Antimikroba Air Berozone, Klorheksidin
dan Natrium Hipoklorit terhadap *Enterococcus
faecalis* (in vitro)

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Spesialis pada Program Studi Konservasi Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Kamizar, drg., SpKG(K)
Pembimbing : Dr. Ratna Meidyawati, drg., SpKG(K)
Penguji : Munyati, drg., SpKG(K)
Penguji : Prof. Dr . Narlan Sumawinata, drg., SpKG(K)
Penguji : Daru Indrawati, drg., SpKG(K)



Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 8 Juli 2010

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Pengasih dan Penyayang, karena atas berkat dan kasihNya, saya dapat menyelesaikan tesis ini. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Spesialis Konservasi Gigi pada Program Studi Konservasi Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Indonesia. Saya menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan, kerja klinik sampai pada penyusunan tesis ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu saya mengucapkan terima kasih kepada:

1. **Kamizar, drg., SpKG(K)**, selaku dosen pembimbing I dan koordinator PPDGS Ilmu Konservasi Gigi FKG UI yang dengan sabar dan penuh perhatian menyediakan waktu, tenaga dan pikiran. Terlebih lagi tak henti-hentinya memberikan saran, semangat dan dorongan yang tak ternilai dari awal penelitian hingga penulisan tesis ini terselesaikan.
2. **Dr. Ratna Meidyawati, drg., SpKG(K)**, selaku pembimbing II yang telah banyak membantu memberikan saran, pengarahan dan bimbingan dalam mengolah dan menganalisis data statistik hasil penelitian ini hingga penulisan tesis ini dapat diselesaikan
3. **Prof. Dr. Narlan Sumawinata, drg., SpKG(K)**, atas waktu, tenaga dan pikiran terutama pada penulisan tata bahasa Indonesia dan penulisan tesis yang baik dan benar
4. **Muniyati, drg., SpKG(K)**, yang telah membantu dan memberi saran yang sangat berharga dan bermanfaat dalam penulisan tesis ini.
5. **Daru Indrawati drg., SpKG(K)**, yang telah membantu dan memberi saran yang sangat berharga dan bermanfaat dalam penulisan tesis ini.
6. Seluruh staf pengajar Program Pendidikan Dokter Gigi Spesialis (PPDGS) Ilmu Konservasi Gigi FKG UI, **Bambang Nursasongko, drg., SpKG(K)**, **Nila Kesuma Djauharie, drg., SpKG(K)**, **Anggraini Margono, drg., SpKG(K)**, **Prof. Dr. Safrida Faruk Husein, drg., SpKG(K)**, **Prof. Dr. Siti Mardewi Soerono Akbar, drg., SpKG(K)**, **Gatot Sutrisno, drg.,**

SpKG(K), Endang Suprastiwi drg., SpKG(K), Dewa Ayu drg., SpKG(K), Dr. Anggraini Afdhal, drg., SpKG(K), Winiarti Sidharta drg., SpKG(K), yang telah memberi bekal ilmu baik formal maupun informal.

7. Kepala PSSP LPPM-IPB yang telah banyak membantu memfasilitasi selama penelitian, dan kepada seluruh jajaran stafnya terutama **Dra. Maryati Surya MSi** yang telah banyak memberikan arahan dalam penelitian.
8. Kepala koordinator Laboratorium Afiliasi Departemen Kimia FMIPA UI yang telah memberikan bimbingan dan bantuan peminjaman alat dan bahan serta tempat untuk pelaksanaan penelitian saya.
9. Pemimpin dan seluruh staf perpustakaan FKG UI yang telah banyak membantu dan memberikan ijin pemakaian fasilitas perpustakaan.
10. Seluruh karyawan FKG UI, khususnya bagian Konservasi Gigi (Pak Yani, Bu Ning, Pak Min, Mbak Yuli dan Mbak Devi), bagian Administrasi (Pak Dar, Bu Dar,), bagian perlengkapan (Pak Keri dan Pak Narko) atas bantuannya selama masa pendidikan.

Rasa hormat dan terimakasih yang mendalam saya sampaikan pada orangtua Max Paath dan Lenny Pangalila yang telah memberikan cinta kasih, dorongan, semangat dan motivasi untuk terus belajar serta dukungan doa yang tidak pernah putus untuk menyelesaikan pendidikan saya. Terimakasih yang tulus saya ucapkan kepada kakak-kakak dan adik saya Sherly, Henry, Arthur atas semangat, bantuan dan dorongannya.

Kepada teman-teman PPDGS Konservasi angkatan 2007 mba Trisna, Cici, Ira, Ocha, mba Yuli, mba Mia, Amel, Tia dan Dida saya ucapkan terima kasih telah bersama-sama menjalani suka-duka perkuliahan dan klinik, terimakasih kalian telah membuka wawasan, hati dan pikiran saya.

Akhir kata, penulis menyadari bahwa penelitian yang sudah dilakukan masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu Penulis terbuka atas berbagai kritik dan saran untuk memperbaiki segala kekurangan

Jakarta, Juli 2010

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Stanny Linda Paath
NPM : 0706196020
Program Studi : Spesialis Ilmu Konservasi Gigi
Departemen : Konservasi Gigi
Fakultas : Kedokteran Gigi
Jenis karya : Tesis

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Daya Antimikroba Air Berozone, Klorheksidin dan Natrium Hipoklorit terhadap *Enterococcus faecalis* (in vitro)

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta
Pada tanggal : Juli 2010
Yang menyatakan



(Stanny Linda Paath)

ABSTRAK

Nama : Stanny Linda Paath
Program Studi : Spesialis Ilmu Konservasi Gigi
Judul : Daya Antimikroba Air Berozone, Klorheksidin dan Natrium Hipoklorit pada *Enterococcus faecalis* (in vitro)

Penelitian ini dilakukan untuk menguji daya antimikroba bahan irigasi air berozone 24 ppm, klorheksidin 1% dan 0,2%, NaOCl 5,25% dan 2,5% terhadap pertumbuhan *E. faecalis* secara in vitro. Bakteri *E. faecalis* ATCC 29212 dibiakkan pada media BHI yang diperkaya dengan *sheep blood* kemudian diinkubasi 24 jam pada suhu 37°C. Bakteri diencerkan pada BHI *broth* dan disesuaikan dengan larutan *McFarland* 0,5 (setara 10⁸ CFU/ml). Ke dalam tabung reaksi diisi 1 ml larutan bahan antimikroba yang diujikan dengan 1 ml larutan BHI dengan bakteri. Setelah diinkubasi 24 jam 37°C, nilai pertumbuhan *E. faecalis* diukur dengan *Elisa reader* untuk mengetahui nilai *Optical Density*. Hasilnya air berozone mempunyai daya antimikroba terhadap pertumbuhan *E. faecalis*. Daya antimikroba air berozone lebih kecil daripada NaOCl 5,25%, NaOCl 2,5% dan klorheksidin 1%. Namun daya antimikroba air berozone sama dengan klorheksidin 0,2%.

Kata kunci: Daya antimikroba, air berozone, klorheksidin, natrium hipoklorit, *Enterococcus faecalis*

ABSTRACT

Name : Stanny Linda Paath
Study Programme : Conservative Specialist
Title : Antimicrobial efficacy of Ozonated Water, Chlorhexidine,
Sodium Hypochlorite against *Enterococcus faecalis*
(in vitro)

The aim of this study was to evaluate antimicrobial efficacy of 24 ppm ozonated water, 5,25% NaOCl , 2,5% NaOCl, 1% chlorhexidine and 0,2% chlorhexidine against *E. faecalis* in vitro. Petri dishes containing BHI agar enriched with sheep blood were seeded with *E. faecalis* ATCC 29212, incubated overnight at 37⁰C. Then the bacteria were suspended in BHI broth to a turbidity of MacFarland 0,5 (10⁸ CFU/ml). An aliquot of 1 ml of the suspension transferred to a tube containing 1 ml of each antimicrobial agents. After incubated 24 hours at 37⁰C, the growth value was counted using Elisa reader to evaluate Optical Density (OD). It was concluded that 24 ppm of ozonated water possessed antimicrobial effect against *E. faecalis*, but not comparable with 5,25% NaOCl, 2,5% NaOCl or 1% chlorhexidine. The ozonated water has the same antimicrobial efficacy as 0,2% chlorhexidine.

Key words: Antimicrobial efficacy, ozonated water, chlorhexidine, sodium hypochlorite, *Enterococcus faecalis*

DAFTAR ISI

	halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI	vi
ABSTRAK	vii
<i>ABSTRACT</i>	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR SINGKATAN	xiii
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar belakang masalah	1
1.2 Rumusan masalah	3
1.3 Tujuan penelitian	3
1.4 Manfaat penelitian	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Perawatan Saluran Akar	5
2.2 <i>Enterococcus faecalis</i> (<i>E. faecalis</i>)	6
2.3 Bahan irigasi saluran akar	10
2.3.1 Natrium hipoklorit	11
2.3.2 Klorheksidin	13
2.3.3 Air berozone	15
2.4 Kerangka teori	20
3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	22
3.1 Kerangka konsep	22
3.2 Hipotesis	22
4. METODE PENELITIAN	23
4.1 Jenis penelitian	23
4.2 Tempat penelitian	23
4.3 Waktu penelitian	23
4.4 Variabel penelitian	23
4.5 Definisi operasional	23
4.6 Bahan	24
4.7 Alat	24
4.8 Cara kerja	25
4.9 Analisa data	26
4.10 Alur penelitian	27

5. HASIL PENELITIAN	28
6. PEMBAHASAN	31
7. KESIMPULAN DAN SARAN	36
DAFTAR PUSTAKA	37
LAMPIRAN 1	
LAMPIRAN 2	

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Beberapa spesies <i>Enterococcus</i> dan habitatnya	8
Tabel 2.2	Kategorisasi spesies <i>Enterococcus</i> berdasarkan fenotip	8
Tabel 4.1	Definisi Operasional	23
Tabel 5.1	Nilai rerata pertumbuhan bakteri pada BHI (OD) setelah diberi bahan antimikroba	28
Tabel 5.2	Nilai kemaknaan pertumbuhan bakteri <i>E. faecalis</i> dalam kelompok perlakuan	29

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Bakteri <i>E. faecalis</i>	6
Gambar 2.2	Diagram dinding sel bakteri <i>E. faecalis</i>	7
Gambar 2.3	Reaksi saponifikasi NaOCl	11
Gambar 2.4	Reaksi kloraminasi NaOCl	12
Gambar 2.5	Molekul klorheksidin	13
Gambar 2.6	Molekul ozon	16
Gambar 2.7	Proses pembuatan ozon di alam	17
Gambar 2.8	Skema kerangka teori	21
Gambar 3.1	Skema kerangka konsep	22
Gambar 4.1	Skema alur penelitian	27
Gambar 5.1	Perbandingan rata-rata nilai OD antara bahan antimikroba tanpa bakteri dengan yang diberi <i>E. faecalis</i> pada masing-masing kelompok perlakuan bahan antimikroba	29

DAFTAR SINGKATAN

1. *E. faecalis* : *Enterococcus faecalis*
2. NaOCl : natrium hipoklorit
3. CHX : klorheksidin
4. BHI : *Brain Heart Infusion*
5. OD : *Optical Density*
6. ATCC : *American Tissue Culture Collection*
7. CFU : *Colony Forming Unit*
8. mg : miligram
9. μg : mikrogram
10. l : liter
11. ml : milliliter
12. nm : nanometer

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Tujuan utama perawatan endodontik adalah menghilangkan atau paling tidak mengurangi jumlah bakteri dari saluran akar. Perawatan endodontik terdiri dari tiga tahap yang dikenal sebagai triad endodontik. Ketiga tahapnya adalah preparasi akses, preparasi saluran akar dan pengisian saluran akar. Preparasi saluran akar dengan instrumentasi mekanik saja hanya dapat mengurangi 50% jumlah bakteri dari saluran akar. Sedangkan morfologi saluran akar sangat kompleks dan banyak daerah yang tidak terpreparasi oleh instrumentasi seperti daerah ramifikasi, istmus, delta, tubulus dentin dan daerah ireguler lainnya. Oleh karena itu diperlukan penggunaan bahan irigasi selama instrumentasi, dibantu dengan aktivitas medikamen saluran akar untuk menghilangkan sisa-sisa bakteri dari saluran akar.^{1,2}

Terdapat sekitar 150 spesies mikroorganisme yang dapat berkolonisasi dalam saluran akar, tetapi hanya 10 sampai 30 jenis yang diketahui pada saluran akar terinfeksi. Mikroorganisme ini juga dapat ditemukan dalam tubulus dentin dan dapat menyebabkan reinfeksi saluran akar jika tidak dihilangkan secara sempurna.³ *Enterococcus faecalis* merupakan bakteri yang dapat ditemukan pada saluran akar terinfeksi yang belum dilakukan perawatan endodontik serta dapat juga ditemukan pada saluran akar dengan perawatan endodontik yang gagal.⁴ Pada penelitian Schimeister dkk (2007), ditemukan *E. faecalis* pada 31% kasus perawatan endodontik ulang dengan kelainan periapiks yang asimtomatik.⁵ Penelitian-penelitian sebelumnya bahkan menemukan bakteri *E. faecalis* pada saluran akar yang telah diobturasi dengan proporsi berkisar 29%-77%.⁶ Bakteri *E. faecalis* mempunyai kemampuan berpenetrasi ke dalam tubulus dentin, dapat hidup tanpa nutrisi, memiliki adhesi yang kuat ke kolagen, dan memperlihatkan resistensi terhadap bahan antimikroba yang biasa digunakan selama instrumentasi saluran akar.²

Natrium hipoklorit dengan konsentrasi 1% - 5,25% merupakan bahan irigasi yang paling banyak digunakan di bidang endodontik. NaOCl mempunyai sifat antimikroba, melarutkan jaringan, tidak mahal, serta mempunyai masa penyimpanan (*shelf life*) yang lama. Klorheksidin 2% juga direkomendasikan untuk digunakan sebagai bahan irigasi karena bersifat antibakteri dan kurang toksik terhadap sel daripada NaOCl. Penelitian *in vitro* yang dilakukan Gomes dkk (2001) menunjukkan bahwa NaOCl 5,25% dapat mengeliminasi *E. faecalis* dalam waktu kurang dari 30 detik, sama dengan waktu yang dibutuhkan klorheksidin 2% dan 1%.⁷ Penelitian *in vitro* Vianna dkk (2004) juga menunjukkan NaOCl dan klorheksidin dapat mengeliminasi *E. faecalis*, bahkan klorheksidin 0,2% hanya membutuhkan 30 detik dibandingkan dengan NaOCl 0,5% yang membutuhkan waktu 30 menit.⁸

Namun penggunaan NaOCl sebagai bahan irigasi harus hati-hati karena bersifat toksik dengan aroma yang menyengat dan menyebabkan korosi pada metal. Bahan ini bila berkontak dengan jaringan mulut dapat menimbulkan efek samping seperti perdarahan, oedem dan ulserasi, serta bersifat sitotoksik terhadap sel epitel dan fibroblas.^{1,9} Klorheksidin juga dilaporkan dapat menyebabkan deskuamasi mukosa, menghambat penyembuhan luka, menghambat perlekatan fibroblas pada permukaan akar, menyebabkan *staining* gigi dan mengubah sensasi rasa.¹ Pada penelitian secara *in vitro*, Cabral dan Fernandes (2007) menyatakan klorheksidin 0,12% dan 0,2% menyebabkan kematian sel alveolar manusia.⁹

Saat ini air berozone sedang diteliti sebagai bahan antiseptik alternatif di kedokteran gigi karena dilaporkan mempunyai sifat antimikroba terhadap *E. faecalis* tetapi memperlihatkan sitotoksitas yang rendah terhadap sel-sel oral. Nagayoshi dkk (2004) menyatakan air berozone tidak menunjukkan sitotoksitas pada sel fibroblas, sama halnya dengan larutan saline PBS (*phosphate-buffered saline*) dan aquades.¹⁰ Hal ini juga didukung oleh penelitian Huth dkk (2006) dengan hasil air berozone menunjukkan toksisitas paling rendah di antara bahan irigasi lain seperti klorheksidin 2%, 0,2% dan NaOCl 5,25% dan 2,25%.¹¹

Di bidang endodontik air berozone dipergunakan sebagai bahan irigasi saluran akar karena selain menunjukkan daya antimikroba, tidak menimbulkan aroma menyengat seperti NaOCl dan tidak menyebabkan *staining* gigi seperti

klorheksidin^{12,13,14} Huth dkk(2009) memperlihatkan air berozone dengan konsentrasi 20 µl/ml dapat mengeliminasi biofilm *E. faecalis*.¹ Cardoso dkk (2008) menyimpulkan bahwa air berozone konsentrasi 24 mg/l yang digunakan sebagai bahan irigasi saluran akar dapat menurunkan jumlah *Candida albicans* dan *E. faecalis* secara signifikan.² Pada penelitian Hems dkk (2005), air berozone dengan konsentrasi 0,68 mg/l efektif pada *E. faecalis* planktonik walaupun tidak efektif menghilangkan biofilm bakteri.¹⁵ Sedangkan menurut Ibrahim dan Abdullah (2008), air berozone dengan konsentrasi 0,1 ppm tidak efektif menghilangkan *E. faecalis* meskipun telah dipapar selama 60 menit. Namun bila dikombinasikan dengan NaOCl 1,31% selama 30 menit, air berozone berhasil menghilangkan bakteri *E. faecalis*.¹⁶ Pada penelitian-penelitian tersebut masih terdapat perbedaan keefektifan air berozone terhadap *E. faecalis*.

1.2 Rumusan masalah

NaOCl dan klorheksidin merupakan bahan irigasi yang terbukti bersifat antimikroba terhadap *E. faecalis* namun penelitian-penelitian melaporkan NaOCl dan klorheksidin bersifat sitotoksik. Air berozone tidak bersifat sitotoksik namun efektivitas daya antimikroba terutama terhadap *E. faecalis* masih mengungkapkan data yang berbeda. Sehingga timbul pertanyaan :

1. Apakah air berozone mempunyai daya antimikroba terhadap pertumbuhan *E. faecalis*?
2. Apakah daya antimikroba air berozone lebih efektif daripada klorheksidin maupun NaOCl terhadap pertumbuhan *E. faecalis*?

1.3 Tujuan penelitian

1. Mengetahui efektivitas daya antimikroba air berozone terhadap pertumbuhan *E. faecalis*
2. Menentukan bahan irigasi air berozone, klorheksidin atau NaOCl yang lebih efektif terhadap *E. faecalis* secara in vitro

1.4 Manfaat penelitian

1. Memberikan informasi ilmiah mengenai daya antimikroba air berozone sebagai bahan irigasi terhadap pertumbuhan *E. faecalis*.
2. Memberikan informasi tentang bahan irigasi alternatif yang efektif terhadap *E. faecalis*.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Perawatan saluran akar

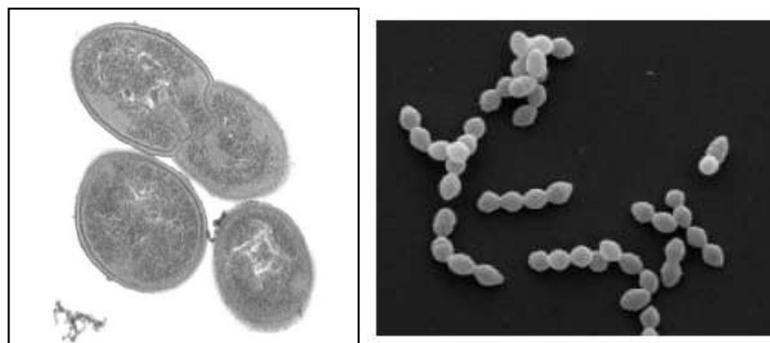
Mikroorganisme merupakan penyebab utama penyakit pulpa dan periapiks. Menghilangkan bakteri dari saluran akar merupakan tujuan utama perawatan saluran akar. Kegagalan menghilangkan bakteri dan produknya secara efektif dapat menyebabkan iritasi persisten. Infeksi endodontik diklasifikasikan sebagai infeksi primer dan infeksi sekunder atau persisten. Infeksi primer adalah infeksi saluran akar akut atau kronik yang terjadi pada gigi yang belum pernah dilakukan perawatan saluran akar. Karakteristik infeksi primer adalah polimikroba, campuran dari 10-30 spesies bakteri dengan jumlah 10^3 - 10^8 bakteri per saluran akar. Infeksi primer didominasi oleh bakteri gram negatif anaerob seperti genus *Treponema* (*T. denticola*, *T. socranskii*), *Fusobacterium* (*F. nucleatum*), *Porphyromonas* (*P. gingivalis*, *P. endodontalis*), *Prevotella* (*P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. tanneriae*), *Dialister* dan *Tannerella*. Namun beberapa bakteri gram positif juga sering ditemukan pada infeksi primer seperti *Pseudoramibacter* (*P. alactolyticus*), *Filifactor* (*F. alocis*), *Actinomyces* (*A. israelii*), *Peptostreptococcus* (*P. anaerobius*), *Micromonas* (*M. micros*), *Streptococcus* (*S. anginosus*) dan *Enterococcus* (*E. faecalis*).¹⁷

Pada infeksi sekunder atau persisten, mikroorganisme tetap ada pada saluran akar yang telah dirawat, menjadi persisten dan bertahan terhadap prosedur perawatan saluran akar. Infeksi sekunder atau persisten didominasi oleh bakteri gram positif anaerob fakultatif seperti bakteri *E. faecalis*. Bakteri ini sering ditemukan pada gigi yang telah dirawat saluran akar dengan prevalensi berkisar 30-90% kasus. Bakteri *E. faecalis* ditemukan 9 kali lebih sering pada saluran akar yang telah dirawat daripada kasus infeksi primer.¹⁷ Penelitian yang dilakukan Pirani dkk (2008) menunjukkan bahwa *E. faecalis* terdeteksi 7,6% pada infeksi endodontik primer dan 39,1% pada infeksi endodontik sekunder.¹⁸

Bakteri *E. faecalis* mempunyai kemampuan berpenetrasi ke dalam tubulus dentin, dapat hidup tanpa nutrisi, memiliki adhesi yang kuat ke kolagen, dan memperlihatkan resistensi terhadap bahan antimikroba yang biasa digunakan selama instrumentasi saluran akar.²

Tujuan perawatan saluran akar dapat dicapai dengan tiga tahap yang dikenal sebagai triad endodontik. Tahap-tahapnya terdiri dari preparasi akses, preparasi saluran akar dan obturasi saluran akar.^{3,19} Preparasi akses adalah faktor yang paling penting karena bila dilakukan dengan baik akan mempermudah bahan irigasi masuk ke dalam saluran akar, mempermudah pembersihan dan pembentukan saluran akar serta pada akhirnya obturasi yang hermetis. Tujuan utama preparasi akses adalah membuka dan mengangkat atap kamar pulpa agar diperoleh penglihatan yang baik, menghemat struktur gigi dengan hanya membuang bagian yang perlu saja serta mendapatkan akses yang lurus ke saluran akar.²⁰ Pendekatan preparasi saluran akar kemomekanik untuk menghilangkan bakteri dicapai dengan menggunakan instrumen untuk membersihkan dan membentuk saluran akar yang dibantu penggunaan bahan irigasi selama instrumentasi, serta aktivitas medikamen saluran akar untuk menghilangkan sisa-sisa bakteri dari saluran akar.³ Tahap akhir dilakukan obturasi saluran akar untuk menghilangkan semua jalan masuk dari rongga mulut ke dalam saluran akar dan untuk menutup atau mengisolasi semua iritan yang tidak dapat dihilangkan saat prosedur *cleaning and shaping*.²¹

2.2 *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*)

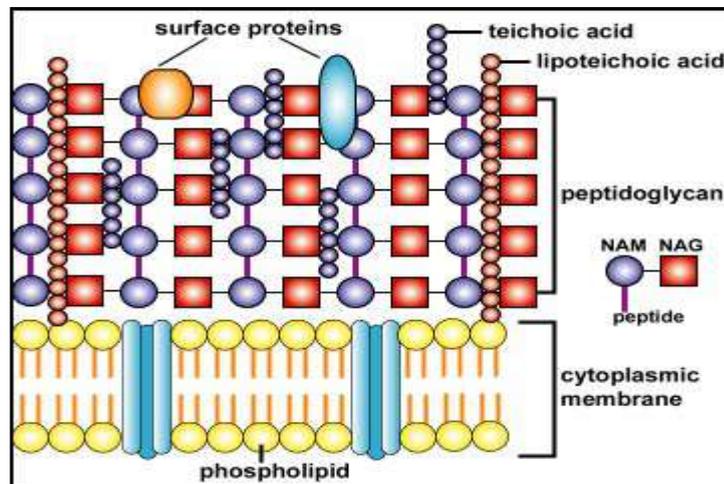


Gambar 2.1 Bakteri *E. faecalis*.²²

Bakteri *E. faecalis* adalah bakteri kokus gram positif dan bersifat fakultatif anaerob (Gambar 2.1). Schleier dan Kilpper Bälz pada tahun 1984 memindahkan

genus *Streptococcus* menjadi *Enterococcus* karena karakteristik *Enterococci* sangat berbeda dengan *Streptococcus*. Ciri-ciri genus ini adalah bentuk selnya kokus atau ovoid, ukurannya 0,6-2,0x 0,6-2,5 μm , dapat berupa soliter, berpasangan atau sebagai rantai pendek, tidak membentuk spora, tidak berkapsul dan katalase negatif. Ciri lainnya adalah membentuk koloni putih seperti krim.

Dinding sel bakteri gram positif biasanya terdiri dari tiga lapisan yaitu kapsul, peptidoglikan dan membran sitoplasma. Namun dinding bakteri *E. faecalis* tidak berkapsul. Pada Gambar 2.2 (diagram dinding sel bakteri *E. faecalis*) terlihat bahwa dinding selnya terdiri dari 2 lapisan yaitu peptidoglikan dan membran sitoplasma. Dinding sel bakteri *E. faecalis* mengandung gula amino (15-20%) lebih banyak, tidak ada lipid dan sedikit asam amino. Lapisan peptidoglikan berfungsi menjaga bentuk sel dan rigiditas. Lapisan peptidoglikan terdiri dari *N-acetylmuramic* dan *N-acetylglucosamine*, serta terikat (*cross link*) dengan rantai peptide. Selain itu, di dalam lapisan peptidoglikan terdapat *teichoic acid* dan *lipoteichoic acid*, yang timbul dari permukaan sel yang berperan dalam densitas muatan negatif (*negative charge density*) pada permukaan bakteri.^{22,23,24,25,26,27}



Gambar 2.2 Diagram dinding sel bakteri *E. faecalis*.²⁷

E. faecalis bersifat fakultatif anaerob, jadi dapat tumbuh pada dua keadaan yaitu ada oksigen dan tanpa oksigen. Mikroba ini dapat hidup pada suhu 10⁰ - 45⁰C, bahkan suhu 60⁰C selama 30 menit. *Enterococci* dapat bertahan hidup pada lingkungan alkalin yang ekstrim yaitu pH 9,6.^{22,23,25} Bahkan penelitian yang

dilakukan McHugh dkk (2004) menyatakan bahwa *E. faecalis* dapat tumbuh sampai pH 11 namun tidak dapat tumbuh pada pH di atas 11,5.²⁸ Pada Tabel 2.1 termaktub beberapa spesies *Enterococcus* dan habitatnya. Spesies *E. faecalis* hidup dalam rongga mulut, binatang, air, makanan dan pada saluran pencernaan manusia dalam jumlah sangat banyak, yaitu $10^5 - 10^8$ colony forming units (CFU) per gram, namun biasanya tidak membahayakan hospes.^{22,23}

Tabel 2.1 Beberapa spesies *Enterococcus* penting dan habitatnya.²²

Spesies	Habitat
<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>	Rongga mulut, saluran pencernaan, binatang, air, makanan
<i>E. gallinarum</i>	Makanan, manusia (tidak sering)
<i>E. casseliflavus</i>	Tanah, tanaman, makanan, manusia (tidak sering)
<i>E. avium</i> , <i>E. hirae</i>	Binatang
<i>E. durans</i>	Manusia, binatang, makanan

E. faecalis dapat mengkatabolisme energi dari karbohidrat, gliserol, laktat, maleat, sitrat, arginin, agmatine, asam α keto, dan tahan terhadap garam empedu, deterjen, logam berat serta etanol. Sekarang ini terdapat 23 spesies *Enterococci* dan terbagi menjadi 5 grup berdasarkan interaksinya dengan manitol, sorbose dan arginin. *E. faecalis* tergabung dalam grup yang sama dengan *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. mundtii* dan *E. gallinarum*. Kelima spesies ini membentuk asam pada *broth* manitol dan menghidrolisis arginin, namun tidak membentuk asam dalam *broth* sorbose. (Tabel2.2)²³

Tabel 2.2 Kategorisasi spesies *Enterococcus* berdasarkan fenotip.²³

Grup	Spesies
Grup I (+) membentuk asam di <i>broth</i> manitol (+) membentuk asam di <i>broth</i> sorbose (-) hidrolisis arginin	<i>E. avium</i> , <i>E. gilvus</i> , <i>E. malodoratus</i> , <i>E. pallens</i> , <i>E. pseudoavium</i> , <i>E. raffinosus</i> , <i>E. saccharolyticus</i>
Grup II (+) membentuk asam di <i>broth</i> manitol (-) membentuk asam di <i>broth</i> sorbose (+) hidrolisis arginin	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. casseliflavus</i> <i>E. gallinarum</i> , <i>E. mundtii</i> , <i>Lactococcus</i> sp.
Grup III (-) membentuk asam di <i>broth</i> manitol (-) membentuk asam di <i>broth</i> sorbose (+) hidrolisis arginin	<i>E. dispar</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. hirae</i> , <i>E. porcinus</i> (<i>E. villorum</i>), <i>E. ratti</i>
Grup IV (-) membentuk asam di <i>broth</i> manitol (-) membentuk asam di <i>broth</i> sorbose (-) hidrolisis arginin	<i>E. asini</i> , <i>E. cocorum</i> , <i>E. sulfurous</i>
Grup V (+) membentuk asam di <i>broth</i> manitol	<i>E. columbae</i> <i>Vagococcus</i> sp.

(--) membentuk asam di *broth* sorbose
(--) hidrolisis arginin

Patogenitas adalah kapasitas mikroba untuk menyebabkan suatu penyakit atau kelainan. Sedangkan virulensi adalah derajat patogenitas atau derajat keparahan penyakit. Bakteri *E. faecalis* memiliki beberapa faktor virulensi seperti enzim litik (*cytolysin*), substansi agregasi, dan *lipoteichoic acid*.^{29,30}

Adhesin berfungsi membantu perlekatan bakteri, berupa *aggregation substance*, *enterococcal surface protein* (Esp) dan *collagen adhesion* (Ace). *Aggregation substance* membantu perlekatan *E. faecalis* dengan bakteri lain sehingga memfasilitasi pertukaran plasmid antara galur *recipient* dan galur donor. Akibatnya materi gen seperti gen yang resisten terhadap antibiotik dapat ditransfer antara galur *E. faecalis* dengan spesies lain. Pada *E. faecalis* terdapat 2 protease yaitu gelatinase dan serine protease. Gelatinase dapat menghidrolisa gelatin, kasein, insulin fibrinogen dan peptide, bahan-bahan yang dapat menjadi sumber nutrisi bagi *E. faecalis*. Serin protease dan *collagen adhesion* (Ace) membantu perlekatan *E. faecalis* ke kolagen tipe I. Kolagen tipe I merupakan komponen organik dentin. Perlekatan *E. faecalis* pada hospes penting karena merupakan tahap awal dimulainya penyakit infeksi. *Cytolysin* adalah toksin *E. faecalis* yang dapat melisis eritrosit, netrofil PMN, makrofag dan menyebabkan kerusakan jaringan. *Bacteriocin* seperti AS-48 menghambat pertumbuhan bakteri lain sehingga *E. faecalis* dapat membentuk monobiofilm tanpa kehadiran bakteri lain. Jadi agar bakteri dapat patogen maka sangat penting mempunyai kemampuan untuk melekat dan menginvasi hospes. Juga harus dapat bertahan terhadap mekanisme pertahanan hospes, bersaing dengan bakteri lain dan membuat kerusakan pada hospes.^{22,29,30}

Ada beberapa cara yang dilakukan *E. faecalis* untuk bertahan hidup yaitu memiliki polimorfisme genetik. *E. faecalis* memiliki protease serine, gelatinase dan *collagen-binding protein* (Ace), yang membantu berikatan dengan dentin. Ukurannya yang kecil, cukup untuk menginvasi dan tinggal dalam tubulus dentin. *E. faecalis* mempunyai kemampuan untuk tetap hidup tanpa suplai nutrisi.³⁰ Penelitian oleh Fidgor dkk (2003) menunjukkan *E. faecalis* dapat bertahan hidup selama 12 bulan tanpa suplai nutrisi. Begitu ada suplai nutrisi, bakteri ini dapat pulih hanya dengan menggunakan serum sebagai sumber nutrisi. Serum ini dapat berasal dari *serum derived fluid* dari jaringan sekitar.³¹ *E. faecalis* dapat membentuk

biofilm yang membuatnya 1000 kali lebih resisten terhadap fagositosis, antibodi dan antimikroba. Bakteri *E. faecalis* dalam tubulus dentin dapat bertahan terhadap medikamen saluran akar kalsium hidroksida selama 10 hari. Kalsium hidroksida merupakan medikamen saluran akar yang terbukti tidak dapat menghilangkan *E. faecalis* terutama saat pH tinggi tidak dapat terjaga. Hal ini karena dua hal, yang pertama adalah *E. faecalis* secara pasif menjaga pH homeostasis dengan permeabilitas membran yang rendah dan kemampuan *buffer* sitoplasma. Yang kedua, *E. faecalis* mempunyai pompa proton yang ikut menjaga pH homeostasis dengan cara memompa proton ke dalam sel untuk menurunkan pH internal. Pada keadaan asam, sistem *antiport* kation akan meningkatkan pH internal dengan keluarnya proton melalui membran sel. Pada keadaan basa, kation atau proton akan dipompa ke dalam sel agar pH internal lebih rendah. Selain itu ada penelitian yang menunjukkan bahwa pada saluran akar yang diberi kalsium hidroksida maka dentin pada saluran akar tersebut mempunyai efek *buffer* yang menjaga agar pH dentin di servikal tidak lebih tinggi dari 10,8 dan pH dentin di apikal tidak lebih dari 9,7. Akibatnya kalsium hidroksida tidak dapat dijaga supaya tetap di pH 11-12. Padahal bakteri *E. faecalis* dapat tumbuh sampai pH 11, sehingga kalsium hidroksida tidak dapat mempertahankan pH tinggi untuk menghilangkan *E. faecalis*.^{23,29}

2.3 Bahan irigasi saluran akar

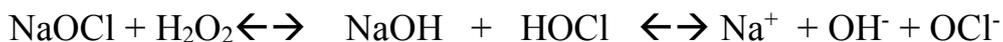
Salah satu hal yang penting pada perawatan saluran akar adalah mendesinfeksi saluran akar dan menyiapkan saluran akar untuk obturasi. Preparasi saluran akar secara kemomekanik menggunakan instrumentasi yang dibantu larutan irigasi selama dan sesudah preparasi. Fungsi irigasi saluran akar adalah untuk membersihkan dan mendesinfeksi sistem saluran akar dari kotoran, sisa jaringan pulpa, bakteri dan toksin. Sifat bahan irigasi yang ideal yaitu dapat melarutkan jaringan dan debris terutama pada daerah yang tidak terjangkau instrument. Bahan irigasi harus dapat melarutkan atau melepaskan sisa-sisa jaringan lunak atau keras supaya dapat dikeluarkan. Toksisitasnya harus rendah, tidak boleh mencederai jaringan periapiks. Tegangan permukaannya rendah, hal ini memungkinkan penetrasi bahan irigasi mengalir ke daerah yang tidak terjangkau. Sifat ideal lainnya adalah sebagai pelumas, membantu alat meluncur dalam saluran akar dan

membuang lapisan *smear* (lapisan ini terdiri dari bakteri, komponen organik dan inorganik yang berasal dari instrumentasi saluran akar). Selain itu harus mudah diperoleh, murah dan dapat disimpan dalam waktu cukup lama.^{32,33} Bahan yang biasa digunakan adalah NaOCl, klorheksidin, EDTA, H₂O₂, povidone iodine dan bahan irigasi alternatif lainnya adalah air berozone.

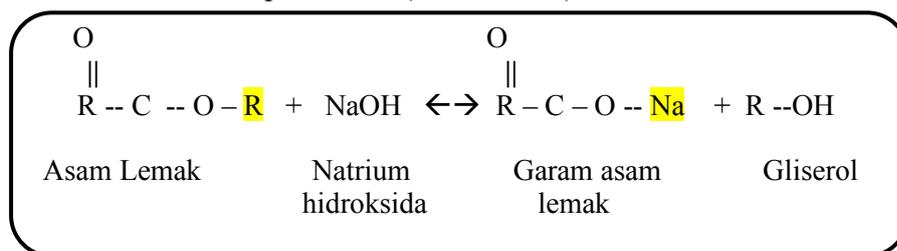
2.3.1 Natrium hipoklorit (NaOCl)

Natrium hipoklorit pada saat ini merupakan bahan irigasi yang paling sering digunakan. Merupakan bahan antimikroba dengan spektrum luas yang terbukti efektif terhadap bakteri, spora, jamur dan virus. Pada suatu penelitian, ditunjukkan bahwa 5,25% NaOCl efektif menghilangkan *C.albicans*, *E.faecalis* dan species *Bacillus*.³⁴

Pecora dkk (dalam Estrela dkk³⁵) melaporkan bahwa NaOCl menunjukkan keseimbangan yang dinamis seperti yang terlihat pada reaksinya:

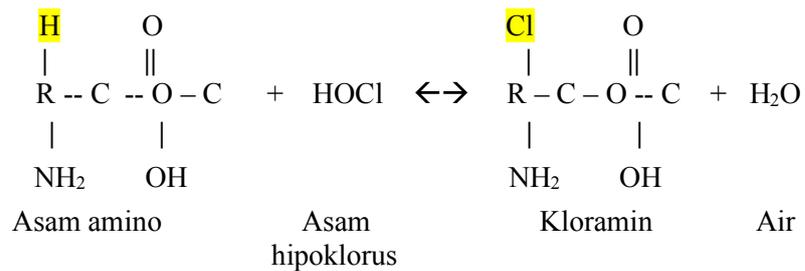


Natrium hidroksida (NaOH) dari NaOCl bekerja mengubah asam lemak pada dinding bakteri menjadi garam asam lemak dan gliserol sehingga terjadi kerusakan pada dinding sel bakteri.³⁵ Cara kerja NaOCl menghancurkan jaringan organik dan lemak ini disebut reaksi saponifikasi (Gambar 2.3).



Gambar 2.3 Reaksi saponifikasi.NaOCl.⁵

Asam hipoklorus (HOCl) dalam NaOCl ketika berkontak dengan jaringan organik akan melarutkan jaringan dengan melepaskan klor. Caranya adalah ion klor dari NaOCl akan mengganti ion hidrogen pada grup amino, yang disebut reaksi kloraminasi (Gambar 2.4). Reaksi kloraminasi ini akan merusak komponen intrasel bakteri sehingga mengganggu metabolisme sel.^{34,35}



Gambar 2.4 Reaksi kloraminasi NaOCl.³⁵

Asam hipoklorus (HOCl) juga bersifat oksidatif pada gugus sulfidril enzim bakteri. Bila enzim ini diinhibisi maka reaksi metabolisme terganggu yang menyebabkan kematian bakteri. Jadi NaOCl menyebabkan kematian mikroorganisme dengan cara pertama-tama merusak dinding sel bakteri sehingga lebih banyak NaOCl yang masuk ke dalam sel dan merusak komponen intrasel bakteri. Pada pH 4-7 NaOCl lebih banyak dalam bentuk asam hipoklorus (HOCl) sedangkan pada pH di atas 9 NaOCl lebih banyak dalam bentuk (OCl⁻).³⁴ Yang tersedia secara luas dan digunakan di bidang endodontik adalah NaOCl dengan pH 12. Namun daya antimikroba NaOCl dengan pH rendah atau tinggi tidak terlalu berbeda. Daya antimikroba NaOCl berkaitan dengan konsentrasinya karena semakin tinggi konsentrasi maka semakin tinggi daya antimikrobanya.³⁶

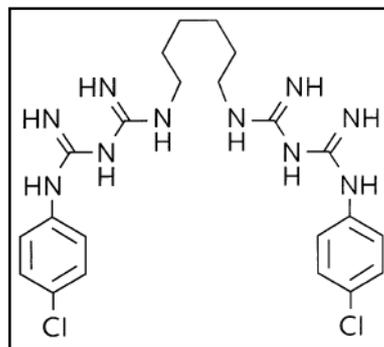
Berber dkk (2006) meneliti keefektifan bermacam-macam konsentrasi NaOCl dan teknik instrumentasi dalam mengurangi *E. faecalis* dalam saluran akar dan tubulus dentin. Konsentrasi NaOCl yang diujikan adalah 5,25%, 2,5% dan 0,5%. Hasilnya tidak ditemukan perbedaan antar konsentrasi dalam membersihkan saluran akar, tapi hanya konsentrasi NaOCl tinggi (5,25%) yang dapat mendesinfeksi tubulus dentin yang tidak terpreparasi oleh alat preparasi saluran akar.³⁷

NaOCl sangat toksik terhadap jaringan vital pada konsentrasi tinggi. Pada konsentrasi rendah, saat NaOCl berkontak dengan jaringan vital maka akan menstimulasi reaksi inflamasi. Pada konsentrasi tinggi yaitu 5,25% dapat menyebabkan iritasi jaringan cukup substansial, dan bila NaOCl sampai kontak dengan jaringan periapiks dapat menyebabkan kerusakan jaringan yang parah.³⁵ Pada konsentrasi lebih besar dari 0,05% dapat menyebabkan kematian fibroblas.³⁸ Komplikasi lain adalah bila NaOCl secara tidak sengaja terdorong ke jaringan periapiks karena dapat menyebabkan kerusakan jaringan yang disertai nyeri,

pembengkakan, pada beberapa kasus bahkan menyebabkan infeksi sekunder, hematoma dan parastesia.³⁹ Oleh karena itu penggunaan natrium hipoklorit sebagai irigasi pada perawatan saluran akar harus hati-hati karena bersifat toksik dengan aroma klorin yang menyengat, menyebabkan korosi pada logam.⁹

2.3.2 Klorheksidin glukonat

Klorheksidin glukonat merupakan bahan irigasi yang mempunyai sifat antimikroba terhadap bakteri gram negatif, bakteri gram positif dan jamur. Molekul klorheksidin ($C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$) terdiri dari 2 cincin simetris 4-klorofenil dan 2 grup biguanida yang dihubungkan dengan rantai heksametilen.^{34,40} (Gambar 2.6)



Gambar 2.5 Molekul klorheksidin.⁴⁰

Molekul klorheksidin merupakan bahan antiplak yang efektif dan rutin digunakan pada perawatan periodonsium dan pencegahan karies. Keefektifannya terhadap *Streptococcus mutans* dan *Lactobacillus* merupakan dasar penggunaannya dalam mencegah karies. Klorheksidin glukonat merupakan molekul bermuatan positif (kation) yang akan diabsorpsi dengan cepat oleh dinding sel bakteri yang bermuatan negatif (anion). Yang berperan menyebabkan dinding sel bakteri bermuatan negatif pada bakteri gram positif adalah grup fosfat pada *teichoic acid*, sedangkan pada bakteri gram negatif adalah lipopolisakarida. Sehingga molekul klorheksidin akan berikatan dengan grup fosfat dan lipopolisakarida. Akibatnya permeabilitas dinding sel bakteri meningkat dan membuat ion dengan berat molekul kecil seperti kalium dan fosfor mulai bocor keluar dari sel. Pada tahap ini klorheksidin dengan konsentrasi rendah (0,2%) bersifat bakteriostatik karena reaksi ini bersifat reversibel. Pada konsentrasi tinggi (2%), klorheksidin bersifat bakterisid

karena molekul klorheksidin akan terus masuk ke dalam sitoplasma bakteri dan menyebabkan presipitasi dan/atau koagulasi komponen intrasel yang pada akhirnya terjadi kematian bakteri.^{34,40}

Klorheksidin 0,2% mempunyai sifat antimikroba yang adekuat sebagai bahan irigasi endodontik, yang diperlihatkan dengan pengurangan *colony forming units* (CFU) yang signifikan.⁴¹ Sen dkk (dalam El Karim³⁴) menyatakan klorheksidin 2% efektif terhadap *C. albican*, juga efektif mengeliminasi bakteri yang berpenetrasi sampai 500 μ m ke dalam tubulus dentin. Klorheksidin bersifat bakteristatik pada konsentrasi rendah 0,2%, bakterisidal pada konsentrasi tinggi 2% dan terabsorpsi ke jaringan gigi dan membran mukus sehingga pelepasannya sedikit demi sedikit pada level terapeutik.³⁴

Pada penelitian secara *in vitro* aktivitas antimikroba klorheksidin dan NaOCl ditemukan bahwa waktu yang dibutuhkan oleh klorheksidin 1% dan 2% untuk mengeliminasi semua mikroorganisme sama dengan waktu yang dibutuhkan oleh NaOCl 5,25%.⁹ Hasil yang sama ditunjukkan oleh Gomes dkk (2001), yang menemukan bahwa klorheksidin 2% sama efektifnya dengan NaOCl 5,2% dalam menghilangkan *E. faecalis*.⁷ Oncağ dkk (2003) membandingkan daya antimikroba klorheksidin 2%, 0,2%, cetremide 0,2% dan NaOCl 5,25% secara *in vitro* dan *in vivo*. Hasilnya menunjukkan bahwa klorheksidin 2% lebih efektif daripada NaOCl 2,5% pada uji *in vitro* maupun *in vivo*.⁴² Dametto dkk (2005) menilai daya antimikroba klorheksidin 2% dan NaOCl 5,25% terhadap *E. faecalis*; hasilnya klorheksidin lebih efektif dalam mengurangi dan menjaga saluran akar bebas dari *E. faecalis* selama 7 hari.⁴³

Klorheksidin merupakan antimikroba yang efektif, namun kekurangannya adalah tidak mempunyai kemampuan melarutkan jaringan, sehingga dicoba dikombinasi dengan NaOCl. Kuruvilla dan Kamath (1998) membandingkan efek klorheksidin 2% dan yang dikombinasi dengan NaOCl 2,5% secara *in vivo*. Hasilnya gigi yang dirawat dengan kombinasi klorheksidin dan NaOCl memperlihatkan pengurangan jumlah mikroorganisme yang terbanyak.⁴⁴ Namun harus diperhatikan adalah interaksi kimia antara kedua bahan irigasi. Dilaporkan terbentuk presipitat berwarna oranye-coklat.. Pembentukan presipitat karena reaksi asam basa yaitu klorheksidin sebagai asam dikationik akan menyumbangkan

proton, sedangkan NaOCl bersifat alkalin sehingga menerima proton. Pertukaran proton ini menyebabkan pembentukan presipitat yang tidak larut. Basrani dkk (2007) menyatakan bahwa presipitat yang terbentuk mengandung *parachloroaniline* (PCA) yang jumlahnya meningkat bersama dengan meningkatnya konsentrasi NaOCl. PCA bersifat toksik dan karsinogenik.⁴⁵

Penelitian yang dilakukan oleh Chang dkk (2001) pada sel ligamen periodonsium manusia secara *in vitro* menunjukkan klorheksidin 0,001% sitotoksik terhadap sel ligamen periodonsium manusia dengan cara menghambat rantai ganda asam nukleat, sintesis protein dan aktivitas mitokondria.⁴⁶ Pada penelitian secara *in vitro* dari Cabral dan Fernandes (2007) terungkap bahwa klorheksidin 0,12% dan 0,2% menyebabkan kematian sel alveolar manusia.⁴⁷

Kekurangan klorheksidin adalah tidak mempunyai kemampuan melarutkan jaringan, tidak dapat menghilangkan lapisan *smear*, bersifat sitotoksik, menyebabkan staining gigi dan mengubah sensasi rasa.^{1,40}

2.3.3 Air berozone (*Ozonated water*)

Ozone (O₃) dengan berat molekul 47,98 g/mol merupakan susunan oksigen yang triatomik (Gambar 2.7), *endothermic* dan *thermodynamically highly instable*, yang bergantung pada kondisi seperti temperatur dan tekanan, serta terdekomposisi menjadi oksigen murni dalam paruh waktunya. Saat terdekomposisi, ozone terpecah menjadi satu atom oksigen (O) dan satu molekul oksigen (O₂). Atom oksigen yang terbentuk akan mengoksidasi semua metal tidak mulia (*nonnoble*) secara langsung. Dan atom oksigen ini berperan sebagai radikal bebas yang menyerang komponen organik. Sehingga material yang digunakan pada pembuatan ozone harus material yang *ozone resistant*.¹²

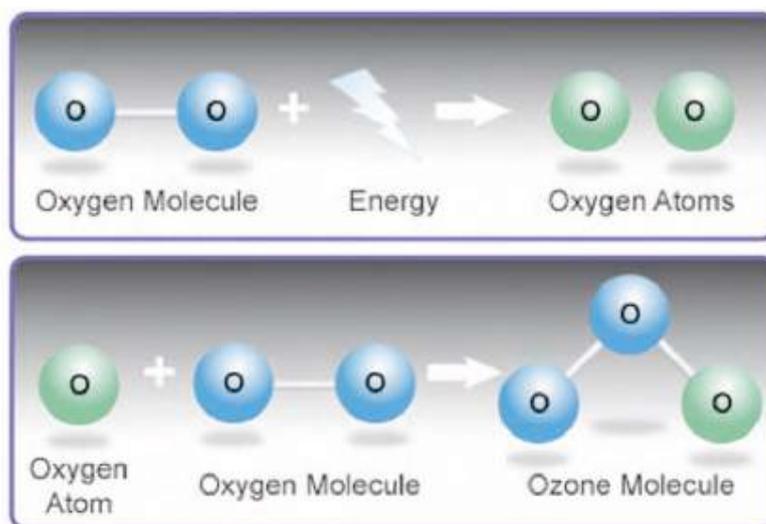


Gambar 2.6 Molekul ozon¹³

Ozone tidak stabil bila terlarut dalam air. Kecepatan dekomposisi berkisar beberapa detik sampai jam, tergantung pada kualitas air (kemurnian air) dan kondisi sistem (temperatur, tempat penyimpanan). Selama terdekomposisi di air, hidroksil (OH) terbentuk sebagai oksidan kedua yang mempercepat proses dekomposisi ozone.¹²

Namun, ozone murni tidak digunakan dalam kedokteran. Yang digunakan adalah campuran ozone dengan oksigen atau larutan ozone pada air suling atau aquabides. Ozon untuk keperluan medis adalah campuran antara oksigen murni dan ozon murni pada rasio 0,05%-5% Ozon (O_3) dan 95%-99,95% oksigen (O_2). Campuran ozon-oksigen sangat *tissue-friendly*, serta mempunyai efek positif pada sifat komposisi darah.^{12,13}

Ozon yang diproduksi secara alami berasal dari arus listrik yang terjadi saat badai. Ozon terbentuk ketika molekul oksigen menerima arus listrik yang memecahnya menjadi dua atom oksigen. Satu atom oksigen kemudian bergabung dengan molekul oksigen lain membentuk molekul O_3 . Sinar ultraviolet matahari juga dapat berperan sebagai arus listrik pada oksigen yang terdapat di stratosfer sehingga menciptakan lapisan ozon yang mengabsorpsi sebagian besar radiasi ultraviolet yang dipancarkan oleh matahari.¹³ (Gambar 2.8)

Gambar 2.7 Proses pembuatan ozon di alam¹³

Sifat mikrobiologik dan metabolik ozon, baik dalam bentuk gas atau air, menjadikan ozon sebagai disinfektan dengan aktivitas luas. Gas ozon telah

diaplikasikan sebagai perawatan untuk lesi karies awal, sterilisasi kavitas, mempercepat penyembuhan luka pada ulserasi dan lesi herpetik. Juga sebagai cairan pembersih pada gigi avulsi dan sebagai pembersih gigi tiruan sebagian lepasan. Ozone dalam bentuk gas maupun *aqueous* menunjukkan daya antimikroba yang kuat terhadap bakteri, fungi, protozoa dan virus.^{12,13,14} Selain di bidang medis, ozone juga digunakan di bidang makanan untuk mengawetkan makanan, kimia dan bidang lain seperti mendesinfeksi air yang akan digunakan untuk air minum.¹⁴

Ozone dalam bentuk gas atau air menunjukkan daya antimikroba yang kuat terhadap bakteri, fungi, protozoa dan virus. Ozone adalah bentuk oksigen yang paling reaktif dan mempunyai efek toksik pada bakteri *microaerophile* dan bakteri anaerob. Daya antimikroba ozone berasal dari oksidasi komponen selular bakteri. Diperkirakan, mekanisme kerjanya adalah ozone menyebabkan kerusakan dinding sel dan membran sitoplasma bakteri dengan mengoksidasi glikoprotein, glikolipid pada membran sel bakteri. Hal ini menyebabkan meningkatnya permeabilitas dinding sel. Kemudian molekul ozone masuk ke dalam sel dan menyerang komponen intrasel dengan mengoksidasi berbagai grup fungsional seperti sulfhidril, amine, alkohol, aldehyd yang terdapat pada protein, enzim dan asam nukleat. Ozone juga menginhibisi dan memblok sistem kontrol enzimatis sel. Akibatnya terjadi gangguan fungsi metabolisme sel dan pada akhirnya menyebabkan kematian mikroorganisme.^{14, 48}

Efek antimikroba ozone bergantung pada konsentrasinya dalam cairan. Ozone tidak stabil dalam cairan, karena itu keefektifannya sebagai desinfektan bergantung pada kecepatannya terdekomposisi. Ukuran atau satuan yang sering digunakan untuk menyatakan konsentrasi air ber ozone adalah $\mu\text{g/ml}$, mg/l atau ppm. Menurut Wu dkk (dalam Dillon⁴⁹) bahwa ozone terdekomposisi dengan cepat menjadi oksigen dalam waktu singkat yaitu 1-10 menit dalam air. Oleh karena itu air ber ozone harus digunakan segera setelah dibuat. Penelitian yang dilakukan oleh Dillon dkk (2009) menyatakan bahwa konsentrasi air ber ozone bertahan 43% lebih lama jika menggunakan aquades dibandingkan air biasa, serta bertahan 30% lebih lama jika menggunakan suhu 15°C daripada suhu 25°C.⁴⁹ Penelitian yang dilakukan Nagayoshi dkk (2004) menyatakan bahwa bila suhu air ber ozone 4°C maka konsentrasi air ber ozone berkurang menjadi setengahnya setelah 120 menit.⁵⁰

Penelitian yang dilakukan oleh Estrela dkk (2007) menunjukkan bahwa tidak ada bahan irigasi yang dapat mengeliminasi *E. faecalis*. Bahan irigasi yang digunakan adalah air berozone, gas ozone, NaOCl 2,5% dan klorheksidin 2% selama 20 menit pada gigi ekstraksi yang di saluran akarnya dikultur dengan *E. faecalis*.⁴⁸ Hasil yang sama ditunjukkan oleh Ibrahim dan Abdullah (2008), air berozone 0,1 ppm tidak dapat menghilangkan *E. faecalis* meskipun telah dipapar selama 60 menit. Namun bila dikombinasi dengan NaOCl 1,31% selama 30 menit berhasil menghilangkan bakteri *E. faecalis*.¹⁶

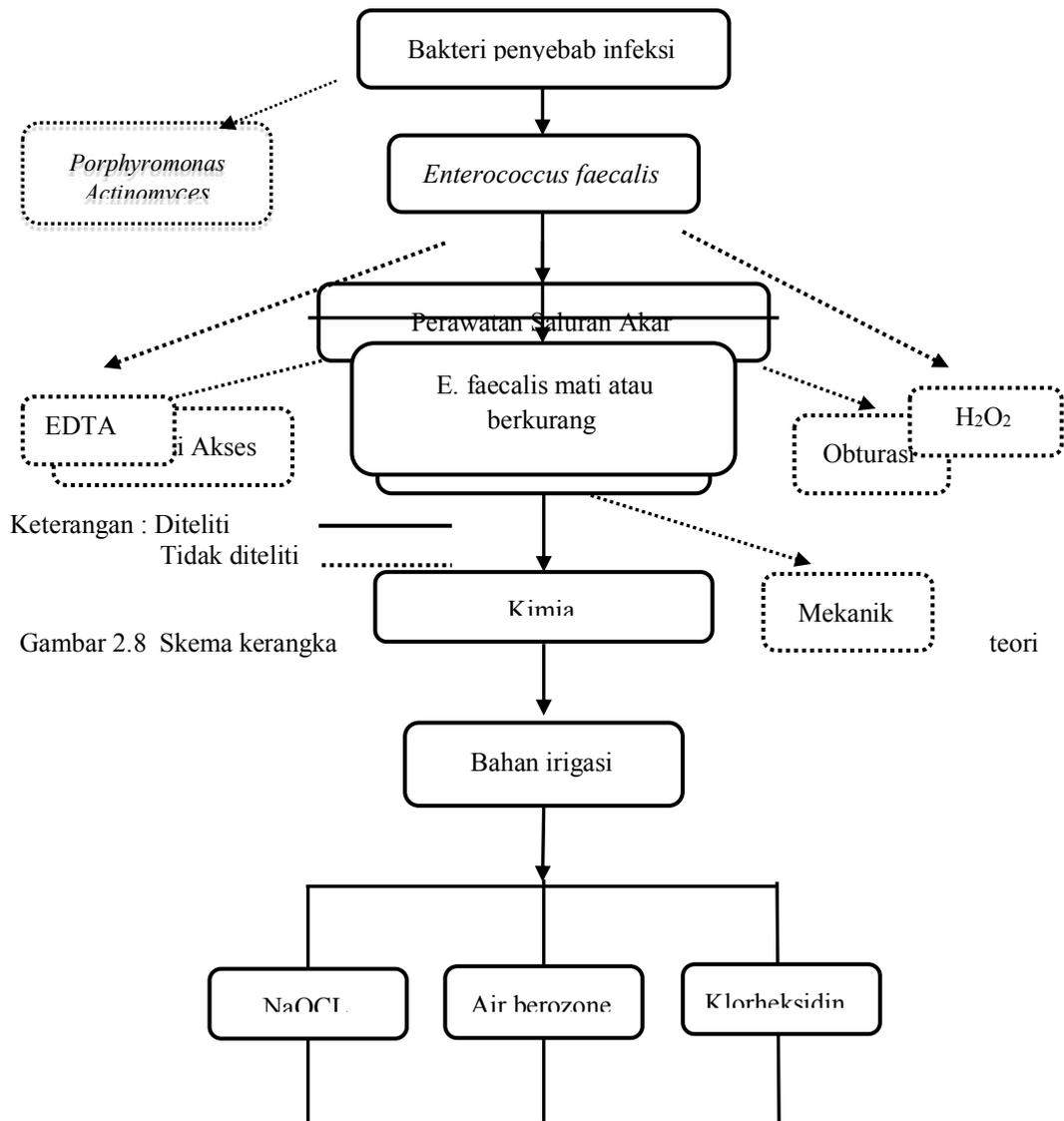
Hasil yang berbeda ditunjukkan oleh Huth dkk (2009). Aplikasi air berozone dengan konsentrasi 20 µg/ml selama 1 menit dapat menghilangkan lebih dari 96% biofilm *E. faecalis* yang dikultur dalam saluran akar selama 3 minggu.¹ Cardoso dkk (2008) menyimpulkan bahwa air berozone konsentrasi 24 mg/l yang digunakan sebagai bahan irigasi saluran akar dapat menurunkan jumlah *Candida albicans* dan *E. faecalis* secara signifikan.² Penelitian Hems dkk (2005) menyatakan bahwa air berozone efektif pada *E. faecalis* planktonik walaupun tidak efektif menghilangkan biofilm bakteri.¹⁵

Nagayoshi dkk (2004) meneliti mengenai daya antimikroba air berozone terhadap mikroorganisme yang menginvasi tubulus dentin *bovine* dan sitotoksitas air berozone terhadap sel fibroblas mamalia. Hasilnya memperlihatkan setelah 10 menit irigasi dengan air berozone, aktivitas antimikroba terhadap *E. faecalis* sama dengan NaOCl 2,5%. Air berozone tidak menunjukkan sitotoksitas pada sel fibroblas, sama halnya dengan larutan saline PBS (*phosphate-buffered saline*) dan aquades. Sedangkan NaOCl 2,5% menyebabkan penurunan jumlah sel fibroblas.⁵⁰ Penelitian sitotoksitas beberapa bahan irigasi saluran terhadap sel epitel (*Human oral epithelial cells*, BHY) dan fibroblas gingiva (HGF-1) dilakukan oleh Huth dkk (2006).¹¹ Hasilnya, air berozone menunjukkan toksisitas paling rendah di antara bahan irigasi lain seperti klorheksidin 2%, 0,2% dan NaOCl 5,25%, 2,25%. Jadi bila diurutkan dari yang paling toksik ke tidak toksik, urutannya adalah NaOCl 5,25%, 2,25%, klorheksidin 2%, 0,25% dan terakhir air berozone dengan konsentrasi 20, 10, 5, 2,5, 1,25 µg/ml.¹¹

2.2 Kerangka teori

Mikroorganisme dan produknya merupakan penyebab utama infeksi pulpa dan periapiks. Salah satunya adalah *Enterococcus faecalis*. Bakteri ini merupakan spesies yang paling resisten pada rongga mulut dan salah satu penyebab gagalnya perawatan saluran akar. Eliminasi bakteri dan produknya dilakukan dengan perawatan endodontik yang terdiri dari tiga tahap atau dikenal sebagai triad endodontik. Ketiga tahapnya adalah preparasi akses, preparasi saluran akar dan pengisian saluran akar. Instrumentasi mekanik saja hanya dapat mengurangi 50% jumlah bakteri dari saluran akar. Sedangkan morfologi saluran akar sangat kompleks dan banyak daerah yang tidak terpreparasi oleh instrumentasi seperti daerah ramifikasi, istmus, delta, tubulus dentin dan daerah ireguler lainnya. Oleh karena itu diperlukan penggunaan bahan irigasi selama instrumentasi.

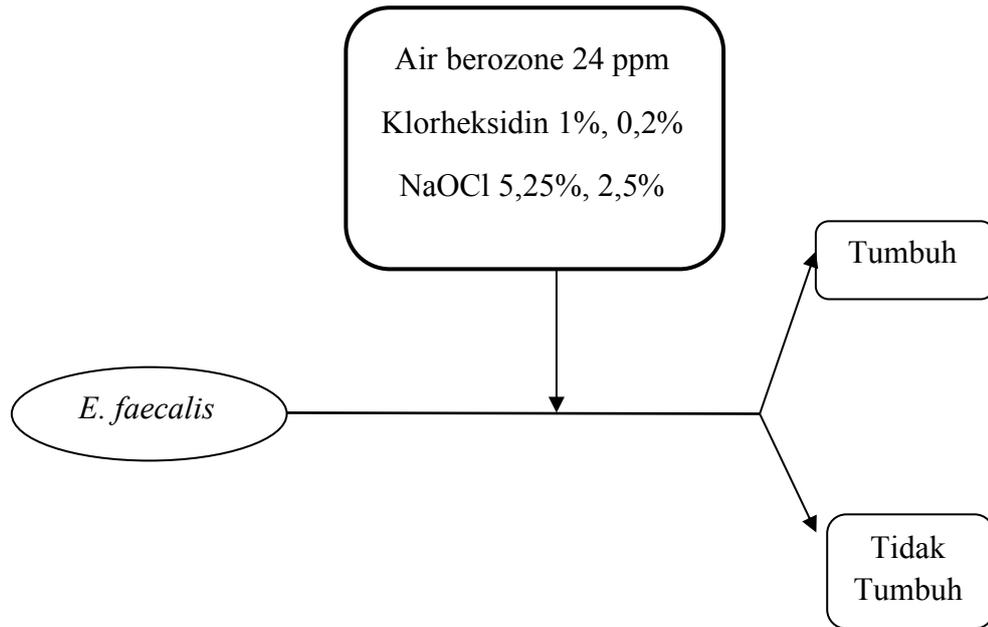
Bahan irigasi yang sering digunakan pada perawatan saluran akar adalah natrium hipoklorit, klorheksidin, *EDTA*, peroksida hidrogen (H_2O_2), povidone iodine dan bahan irigasi alternatif lainnya adalah air berozone. Penelitian-penelitian menunjukkan NaOCl dan klorheksidin dapat mengeliminasi *E. faecalis*. Namun penggunaan NaOCl bersifat sitotoksik terhadap sel epitel dan fibroblast, beraroma menyengat dan dapat menyebabkan korosi pada metal. Sedangkan klorheksidin dilaporkan dapat menyebabkan deskuamasi mukosa, menghambat penyembuhan luka, menghambat perlekatan fibroblas pada permukaan akar, menyebabkan *staining* gigi dan mengubah sensasi rasa.. Air berozone mulai digunakan sebagai bahan irigasi saluran akar karena menunjukkan daya antimikroba, namun tidak menimbulkan aroma menyengat seperti NaOCl dan tidak menyebabkan *staining* gigi seperti klorheksidin.



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka konsep



Gambar 3.1 Skema kerangka konsep

Air berozone, klorheksidin dan NaOCl akan dipaparkan pada biakan *Enterococcus faecalis*. Kemudian dilihat efeknya terhadap pertumbuhan bakteri *E. faecalis*.

3.2 Hipotesis

1. Air berozone mempunyai daya antimikroba terhadap *E. faecalis*
2. Daya antimikroba air berozone lebih efektif daripada klorheksidin 1%, 0,2% maupun NaOCl 5,25% dan 2,5% dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. faecalis*.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis penelitian

Ekspirimen laboratorik

4.2 Tempat penelitian

Laboratorium Mikrobiologi dan Imunologi PPSP IPB Bogor

Laboratorium Kimia Afiliasi FMIPA UI Depok

4.3 Waktu penelitian

Mei, Juni 2010

4.4 Variabel penelitian

- Variable terikat : pertumbuhan *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- Variabel bebas : air berozone, klorheksidin 1%, klorheksidin 0,2%, NaOCl 5,25%, NaOCl 2,5%
- Variable terkendali : jumlah bakteri *E. faecalis*, waktu inkubasi bakteri

4.5 Definisi operasional

Tabel 4.1 Definisi operasional

Variabel	Definisi Operasional	Cara mengukur	Skala
1. <i>E. faecalis</i>	Bakteri gram positif anaerob fakultatif dari ATCC 29212 (berasal dari bagian Mikrobiologi FKUI sebanyak 10^8 CFU/ml)	Dibandingkan dengan larutan McFarland 0,5	
2. Tumbuh	Terjadi pertumbuhan bakteri pada media perbenihan. Terlihat dengan adanya kekeruhan yang dinyatakan dalam OD. Semakin tinggi nilai kekeruhan semakin banyak pertumbuhan kuman	Kekeruhan yang dinyatakan dengan OD	Rasio
3. Tidak tumbuh	Terjadi pertumbuhan bakteri dalam media perbenihan. Terlihat dengan adanya kekeruhan yang dinyatakan dalam OD. Semakin kecil nilai kekeruhan semakin sedikit pertumbuhan kuman	Kekeruhan yang dinyatakan dengan OD	Rasio

Variabel	Definisi Operasional	Cara mengukur	Skala
4. Optical Density	Nilai kuantitas atau kepadatan sel-sel bakteri atau residu dalam suatu larutan yang dihitung dengan alat <i>Elisa reader</i>	Menggunakan alat <i>Elisa reader</i>	
5. Air berozone	Bahan antimikroba yang dibuat dengan cara melarutkan gas ozon ke dalam 100 ml aquabides selama 15 menit sehingga didapatkan konsentrasi 24 ppm	Metode titrasi	Nominal
6. Klorheksidin	Bahan antiseptik dan desinfektan dengan konsentrasi 2% yang diencerkan dengan aquabides sampai konsentrasinya mencapai 0,2% dengan menggunakan rumus $C1.V1 = C2.V2$	Konsentrasi 1% Konsentrasi 0,2%	Nominal
7. NaOCl	Bahan antiseptik dan desinfektan dengan konsentrasi 12%, yang diencerkan dengan aquabides sampai konsentrasinya mencapai 10,5% dan 5,25% dengan menggunakan rumus $C1.V1 = C2.V2$	Konsentrasi 5,25% Konsentrasi 2,5%	Nominal

4.6 Bahan : Kuman *E. faecalis* ATCC 29212
 Air berozone
 Agar BHI yang diperkaya dengan *sheep blood*
 Larutan BHI
 Aquabides steril
 Klorheksidin 2%
 NaOCl 10% dan 5,25%
 Larutan standard Mc Farland 0,5

4.7 Alat : Ozone generator merek ionizer 360 mg/jam
 Cawan petri
 Lampu spiritus
 Sengkelit
 Pipet
 Tabung reaksi
Microplate (Tissue Culture Plate)
Elisa reader
 Inkubator
 Mikropipet

4.8 Cara kerja

4.8.1 Persiapan sampel kuman

Bakteri *E. faecalis* ATCC 29212 dari dalam tabung agar (berasal dari bagian mikrobiologi FK UI) diambil dan dibiakkan dalam media agar BHI yang diperkaya dengan *sheep blood*, kemudian diinkubasi dalam inkubator pada temperatur 37°C selama 24 jam.

4.8.2 Penyesuaian suspensi bakteri terhadap densitas 0,5 McFarland

Selanjutnya diambil tiga sampai lima koloni kuman dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah diisi dengan 10 ml larutan BHI, kemudian kekeruhannya disesuaikan dengan larutan standard McFarland 0,5 (setara dengan 10⁸ CFU/ml). Penyesuaian ini dibantu dengan cara membandingkan larutan McFarland dengan suspensi bakteri terhadap latar belakang kertas putih dengan kontras garis hitam.

4.8.2 Pembuatan air berozone

Aquabides 100 ml diletakkan dalam gelas Erlenmeyer kemudian diberikan gas ozone selama 15 menit. Konsentrasi yang didapatkan adalah 24 ppm berdasarkan pengujian yang dilakukan di Laboratorium Kimia Afiliasi FMIPA UI Depok dengan metode titrasi.

4.8.3 Pengujian

Disiapkan tabung reaksi, selanjutnya diisi dengan 1 ml larutan bahan irigasi yang diujikan dan 1 ml larutan BHI dengan atau tanpa bakteri *E. faecalis*.

Kelompok 1	(n=8)	:	1 ml	Air berozone	+	1 ml	BHI <i>E. faecalis</i>
Kelompok 2	(n=8)	:	1 ml	NaOCl 5,25%	+	1 ml	BHI <i>E. faecalis</i>
Kelompok 3	(n=8)	:	1 ml	NaOCl 2,5%	+	1 ml	BHI <i>E. faecalis</i>
Kelompok 4	(n=8)	:	1 ml	CHX 1%	+	1 ml	BHI <i>E. faecalis</i>
Kelompok 5	(n=8)	:	1 ml	CHX 0,2%	+	1 ml	BHI <i>E. faecalis</i>
Kelompok 6	(n=8)	:	2 ml	BHI <i>E. faecalis</i>			(sebagai kontrol)
Kelompok 7	(n=8)	:	1 ml	Air berozone	+	1 ml	BHI
Kelompok 8	(n=8)	:	1 ml	NaOCl 5,25%	+	1 ml	BHI
Kelompok 9	(n=8)	:	1 ml	NaOCl 2,5%	+	1 ml	BHI
Kelompok 10	(n=8)	:	1 ml	CHX 1%	+	1 ml	BHI

Kelompok 11 (n=8) : 1 ml CHX 0,2% + 1 ml BHI
Kelompok 12 (n=8) : 2 ml BHI (sebagai kontrol)

CHX : klorheksidin

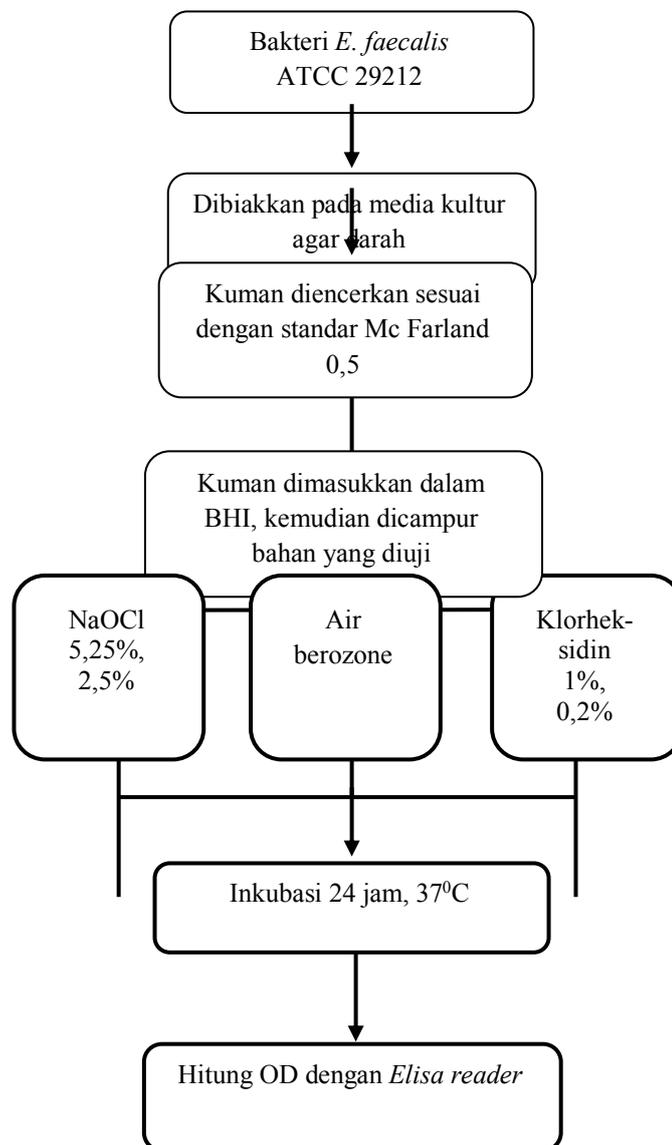
4.8.4 Pengamatan dan Pengukuran

Setelah 24 jam tabung reaksi dikeluarkan dari inkubator kemudian dari setiap tabung reaksi diambil 200 μ l kemudian dimasukkan dalam *microplate*. Dilakukan hitung OD dengan alat *Elisa reader* dengan panjang gelombang 490 nm.

4.9 Analisa data

Data yang diperoleh dianalisa secara statistik dengan cara seperti berikut: pertumbuhan *E. faecalis* dalam bentuk *Optical Density* diuji normalitas data memakai uji *Shapiro Wilk*. Homogenitas data dianalisis berdasarkan data setelah perlakuan dengan menggunakan uji analisis varians satu arah. Bila terdapat perbedaan bermakna, diteruskan dengan uji perbandingan multipel dengan prosedur *Tukey Honestly Significant Difference* (HSD).

4.10 Alur penelitian



Gambar 4.1 Skema alur penelitian

BAB 5

HASIL PENELITIAN

Pada penelitian ini bakteri *E. faecalis* dipaparkan bahan antimikroba air berozone 24 ppm, NaOCl 5,25%, NaOCl 2,5%, klorheksidin 1% dan klorheksidin 0,2%. Kemudian diinkubasi dalam media BHI selama 24 jam dengan temperatur 37°C. Penilaian efektivitas bahan antimikroba diujikan pada media cair BHI *broth* dengan mengukur *Optical Density* (OD). Gambaran BHI keruh menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri pada media tersebut, hal ini terlihat dengan nilai OD yang tinggi. Makin tinggi nilai OD maka efektivitas antimikroba semakin berkurang.

Tabel 5.1 Nilai rerata pertumbuhan bakteripada BHI (OD) setelah diberi bahan antimikroba

Bahanirigasi	n	BHI+bakteri <i>E. faecalis</i>		99% CI	
		Rerata	SD	Lower bound	Upper bound
Air Ozone	8	112,38 .10 ⁻³	0.005829	105,16 .10 ⁻³	119,59 .10 ⁻³
NaOCl 5,25%	8	5,00 .10 ⁻³	0.002726	1,63 .10 ⁻³	8,37 .10 ⁻³
NaOCl 2,5%	8	17,75 .10 ⁻³	0.004268	12,47 .10 ⁻³	23,03 .10 ⁻³
CHX 1%	8	60,63 .10 ⁻³	0.005263	54,11 .10 ⁻³	67,14 .10 ⁻³
CHX 0,2%	8	110,13 .10 ⁻³	0.021013	84,13 .10 ⁻³	136,12 .10 ⁻³
BHI	8	259,63 .10 ⁻³	0.009546	247,81 .10 ⁻³	271,44 .10 ⁻³

CHX : klorheksidin

Pada Tabel 5.1 di atas terlihat bahwa nilai OD kelompok NaOCl 5,25% adalah yang paling rendah ($5,00 \times 10^{-3}$) sedangkan nilai yang paling tinggi terlihat pada kelompok BHI yang dikultur dengan *E. faecalis* ($259,63 \times 10^{-3}$). Nilai OD kelompok air berozone ($112,38 \times 10^{-3}$) paling tinggi di antara bahan antimikroba yang diuji, akan tetapi sama dengan oleh klorheksidin 0,2% ($110,13 \times 10^{-3}$). Hal ini berarti kemampuan antimikroba air berozone dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. faecalis* sama dengan klorheksidin 0,2%. Namun bila dibandingkan dengan bahan antimikroba lainnya efektivitas antimikroba air berozone paling kecil.

Selanjutnya data tersebut diuji secara statistik untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan bermakna nilai OD di antara kelompok perlakuan tersebut.

Pada uji kemaknaan one way ANOVA didapat nilai $p = 0.000$. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa secara keseluruhan terdapat perbedaan yang bermakna pertumbuhan *E. faecalis* di antara keenam kelompok tersebut karena nilai p lebih kecil dari 0,01. Untuk mengetahui kelompok mana yang mempunyai perbedaan, dilakukan analisis post hoc.

Tabel 5.2 Nilai kemaknaan pertumbuhan bakteri *E. faecalis* dalam kelompok perlakuan

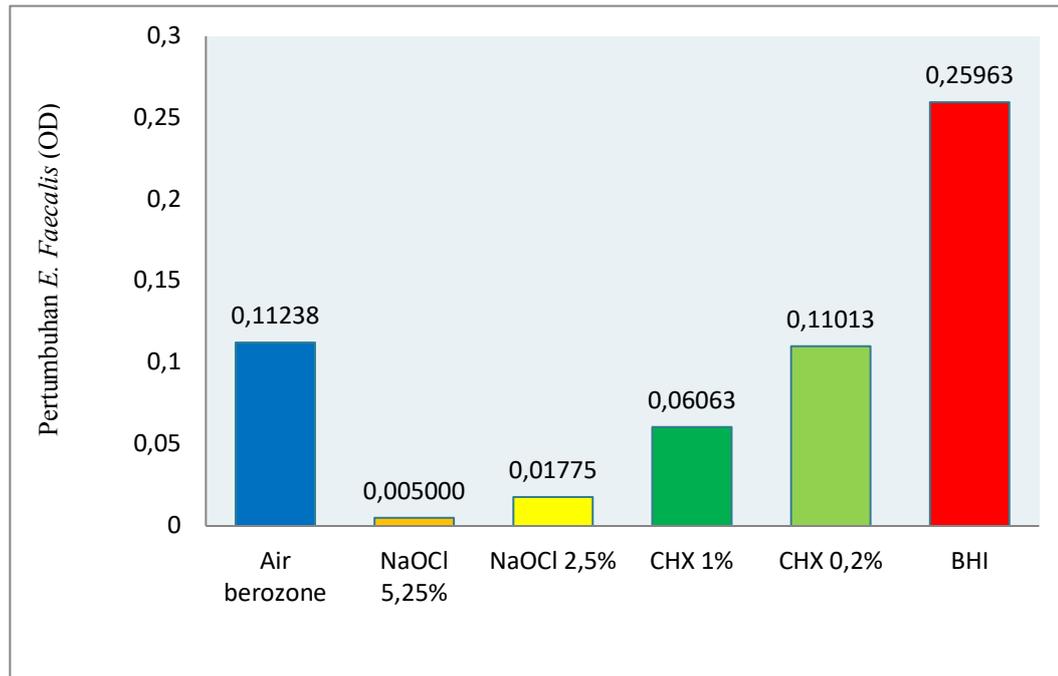
Kelompok	NaOCl 5,25%	NaOCl 2,5%	CHX 1%	CHX 0,2%	BHI
Air berozone	0,000*	0,000*	0,000*	1,000	0,000*
NaOCl 5,25%		0,069	0,000*	0,000*	0,000*
NaOCl 2,5%			0,000*	0,000*	0,000*
CHX 1%				0,000*	0,000*
CHX 0,2%					0,000*

Ket. *batas kemaknaan $p < 0,01$ menggunakan uji analisis *Tukey HSD*

CHX : klorheksidin

Pada Tabel 5.2 terlihat perbedaan bermakna antara nilai OD pertumbuhan bakteri *E. faecalis* kelompok air berozone dengan hampir semua kelompok bahan antimikroba kecuali kelompok klorheksidin 0,2%. Hal ini berarti kemampuan antimikroba air berozone dalam menghambat pertumbuhan bakteri sama dengan klorheksidin 0,2%. Namun bila dibandingkan dengan bahan antimikroba lainnya efektivitas antimikroba air berozone paling kecil. Nilai OD pertumbuhan *E. faecalis* antara kelompok NaOCl 5,25% dengan kelompok NaOCl 2,5% tidak berbeda bermakna dengan nilai $p = 0,069$, artinya kemampuan antimikroba NaOCl 5,25% dalam menghambat pertumbuhan bakteri sama dengan NaOCl 2,5%.

Terdapat perbedaan bermakna nilai OD pertumbuhan *E. faecalis* antara kelompok NaOCl 2,5% dan kelompok klorheksidin 1% (nilai $p = 0,000$) dan dengan kelompok klorheksidin 0,2% (nilai $p = 0,000$). Hal ini berarti kemampuan antimikroba NaOCl 2,5% lebih baik daripada klorheksidin 1% maupun 0,2%. Terdapat perbedaan bermakna nilai OD pertumbuhan *E. faecalis* antara kelompok klorheksidin 1% dan kelompok klorheksidin 0,2% dengan nilai $p = 0,000$. Hal ini menunjukkan kemampuan antimikroba klorheksidin 1% lebih baik daripada klorheksidin 0,2%. Jadi bila diurutkan maka kemampuan antimikroba NaOCl 5,25% sama dengan NaOCl 2,5%. Diikuti klorheksidin 1%, kemudian air berozone 24 ppm dan klorheksidin 0,2%.



Gambar 5.1 Perbandingan rata-rata nilai OD antara bahan antimikroba tanpa bakteri dengan yang diberi *E. faecalis* pada masing-masing kelompok perlakuan bahan antimikroba

Pada gambar 5.1 terlihat ada perbedaan bermakna nilai OD antara kelompok air berozone yang diberi bakteri dan yang tanpa bakteri. Perbedaan bermakna juga terdapat pada kelompok NaOCl 2,5%, kelompok klorheksidin 0,2% dan kelompok BHI. Namun pada kelompok NaOCl 5,25% dan kelompok klorheksidin 1% tidak terdapat perbedaan pertumbuhan antara kelompok bahan antimikroba yang diberi bakteri dan yang tanpa bakteri.

BAB 6 PEMBAHASAN

Pada penelitian ini digunakan bakteri *Enterococcus faecalis* untuk uji kepekaan kuman terhadap beberapa bahan irigasi. Bakteri ini dipilih karena paling resisten dan sulit untuk dihilangkan serta banyak ditemukan pada kasus-kasus perawatan ulang dengan persentase yang tinggi. Selain itu *E. faecalis* mempunyai karakteristik yang tahan terhadap suasana dengan pH tinggi, mampu bertahan pada lingkungan dengan sedikit makanan, tidak bergantung kepada bakteri lain dan dapat tumbuh dan hidup sebagai monokultur dibawah kondisi nutrisi yang sedikit.

Bakteri *E. faecalis* yang digunakan pada penelitian ini strain murni *E. faecalis* ATCC 29212, yang berasal dari bagian Mikrobiologi FKUI dengan tahap *passage* pertama. *Passage* adalah proses subkultur sel yang melibatkan pemindahan sejumlah bakteri ke medium pertumbuhan baru. Hal ini dilakukan untuk menghindari densitas sel yang makin tinggi dalam medium. *Passage* maksimal adalah *passage* ke empat karena semakin sering dilakukan proses *passage* maka dapat menyebabkan perubahan fenotip dan genotip bakteri atau bahkan menyebabkan mutasi bakteri.⁵¹

Koleksi bakteri pada ATCC (*American Type Culture Collection*) tersedia secara komersial 69 jenis biakan murni (*isolate*) bakteri *E. faecalis*. Setiap jenis mempunyai nomor dan deskripsi ATCC yang berbeda. Level keamanan berkisar antara 1 sampai 2 dan kondisi pertumbuhan berbeda antara tiap subtype.²³

Pada penelitian ini, untuk menilai efektivitas bahan antimikroba dilakukan uji pada media cair *BHI broth* dengan mengukur *Optical Density*. Tujuannya adalah untuk menguji sensitivitas bakteri. Penelitian-penelitian sebelumnya menggunakan gigi sebagai tempat kultur bakteri. Namun variasi anatomi saluran akar dapat menyebabkan perbedaan respons pertumbuhan bakteri pada setiap gigi selama periode inkubasi dan menyebabkan perbedaan paparan terhadap bahan antimikroba. Faktor-faktor ini dapat menyebabkan bias. Untuk menghindari bias dibutuhkan

sampel yang lebih banyak, prosedur menjadi lebih rumit dan lebih lama karena harus mengumpulkan, menyeleksi dan mempreparasi saluran akar.¹⁶

Setelah pemaparan bakteri terhadap bahan antimikroba, dilakukan pengukuran jumlah bakteri. Ada beberapa cara pengukuran jumlah bakteri, ada yang mengukur jumlah bakteri secara langsung dan secara tidak langsung. Penghitungan secara langsung yaitu *plate count*. Namun metode ini lebih sulit dan membutuhkan prosedur kerja lebih panjang serta rumit. Setiap sampel harus dilakukan kira-kira 8-10 kali pengenceran. Dari setiap hasil pengenceran diambil beberapa ml untuk ditumbuhkan pada *agar plate*. Setelah inkubasi 24 jam, jumlah bakteri dari setiap *plate* dihitung. Jumlah bakteri yang dapat diterima jika jumlahnya 300 – 30 koloni. Bila dalam satu *plate* terdapat lebih dari 300 koloni, maka akan sulit untuk dihitung sedangkan bila kurang dari 30 koloni maka penghitungan dianggap kurang akurat.

Metode penghitungan jumlah bakteri pada penelitian ini adalah secara tidak langsung yang dihitung oleh *Elisa reader* dan hasilnya berupa *Optical Density* (OD). Prinsip dasar metode ini yaitu bahwa partikel kecil seperti bakteri memantulkan sinar yang melewati suspensi bakteri tersebut. Jumlah sinar yang dipantulkan berbanding lurus dengan jumlah bakteri yang ada. Dan karena bentuk sel relatif sama, maka jumlah sel dapat diukur secara tidak langsung dari jumlah sinar yang mencapai alat deteksi setelah melewati suspensi larutan. Jadi semakin banyak pertumbuhan bakteri maka larutan suspensi bakteri akan makin keruh, nilai *Optical density* (OD) akan semakin tinggi. Cara ini lebih mudah dan sederhana namun metode ini tidak dapat membedakan bakteri yang hidup maupun yang mati. Nilai OD yang ada merupakan jumlah total dari bakteri yang hidup dan yang mati.

Media yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah BHI yang mengandung bahan organik seperti *Calf brain infusion solid*, *beef heart infusion solid*, protease pepton, glukosa, dan bahan inorganik seperti natrium klorida dan dinatrium fosfat. Menurut penelitian yang dilakukan Restaino (1995), sensitivitas mikroorganisme terhadap ozone sangat dipengaruhi oleh bahan organik.⁵² Menurut Hems dkk (2005) adanya bahan organik dalam medium untuk kultur *E. faecalis* dapat memproteksi bakteri dengan menyediakan target untuk ozone, sehingga melindungi bakteri dari ozone. Akibatnya daya antimikroba air ber ozone menjadi lebih kecil.¹⁶

Hasil penelitian ini, yang dapat dilihat pada Tabel 5.1 menunjukkan bahwa air berozone mempunyai daya antimikroba terhadap pertumbuhan *E. faecalis*. Namun daya antimikroba air berozone lebih kecil dari daya antimikroba NaOCl 5,25%, NaOCl 2,5% dan klorheksidin 1%. Hasil yang sama diperlihatkan oleh Cardoso dkk (2008) yang menyatakan bahwa air berozone konsentrasi 24 mg/l yang digunakan sebagai bahan irigasi saluran akar dapat menurunkan jumlah *E. faecalis* secara bermakna.² Nagayoshi dkk juga (2004) menunjukkan air berozone menyebabkan pengurangan jumlah bakteri *E. faecalis* namun tidak menyebabkan eliminasi total seperti yang diperlihatkan NaOCl 2,5%.¹¹

Hasil yang berbeda ditunjukkan oleh penelitian Huth dkk (2009) yang menyatakan bahwa air berozone dengan konsentrasi lebih kecil yaitu 5 ppm dapat menghilangkan *E. faecalis* secara total. Metode yang digunakan adalah bakteri dilarutkan dalam larutan salin kemudian dipaparkan dengan air berozone, setelah itu dikultur 24 jam pada *agar plate* untuk dihitung jumlah bakteri (CFU).¹² Tidak ada bahan organik yang mempengaruhi air berozone secara langsung sehingga didapatkan hasil eliminasi total bakteri *E. faecalis*. Metode dan media pertumbuhan bakteri yang berbeda, mungkin menyebabkan hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian sebelumnya.

Kelemahan air berozone adalah daya antimikroba air berozone bergantung pada konsentrasi. Semakin tinggi konsentrasi semakin besar kemampuan menghilangkan bakteri. Ozone tidak stabil dalam cairan, karena itu keefektifannya sebagai desinfektan bergantung pada kecepatannya terdekomposisi melalui reaksi berantai yang kompleks. Semakin cepat terdekomposisi semakin cepat konsentrasinya berkurang. Kecepatan terdekomposisi tergantung pada kualitas air, temperatur dan tempat penyimpanan. Hal ini yang mungkin menyebabkan daya antimikrobanya rendah.^{11,50}

Pada Tabel 5.2 nilai OD NaOCl 5,25% tidak berbeda bermakna dengan NaOCl 2,5%, artinya daya antimikroba kedua konsentrasi tersebut sama daya antimikrobanya dalam menghilangkan bakteri *E. faecalis*. Berbeda dengan penelitian Berber dkk (2006) yang menyatakan tidak ditemukan perbedaan antar konsentrasi 5,25% dengan 2,5% dalam membersihkan saluran akar, tapi hanya konsentrasi NaOCl tinggi (5,25%) yang dapat mendesinfeksi tubulus dentin yang

tidak terpreparasi oleh alat preparasi saluran akar.³⁷ Namun penggunaan konsentrasi 5,25% berarti sitotoksitasnya juga lebih besar, maka berdasarkan penelitian ini disarankan penggunaan konsentrasi 2,5% sehingga sifat toksik terhadap jaringan lebih kecil namun tetap efektif dalam menghilangkan bakteri.

Daya antimikroba NaOCl 5,25% dan 2,5% pada penelitian ini lebih besar daripada klorheksidin 1%. Hasil ini berbeda dengan Vianna dkk (2005) yang menunjukkan klorheksidin 2% dan 1% sama efektifnya dengan NaOCl 5,25% terhadap *E. faecalis*.⁸ Menurut Estrela dkk (2003) hasil yang berbeda dihasilkan bila menggunakan metode yang berbeda. Penelitiannya membandingkan NaOCl 2% dengan klorheksidin 2% dengan 2 metode yaitu metode *direct exposure test* dan *agar diffusion* (menghitung zona hambat). Jika menggunakan metode *direct exposure test* NaOCl 2% memperlihatkan hasil yang lebih baik daripada klorheksidin 2%, sedangkan bila menggunakan metode menghitung zona hambat maka klorheksidin 2% lebih baik daripada NaOCl 2%. Hal ini terjadi karena pada metode zona hambat NaOCl 2% sulit larut dan berdifusi ke dalam medium agar yang padat. Sedangkan pada *direct exposure test*, NaOCl yang memiliki sifat antimikroba dan melarutkan bahan organik dapat berkontak langsung dengan bakteri dan media BHI.⁵³ Pada penelitian ini media BHI yang dipaparkan NaOCl menyebabkan larutan menjadi jernih karena larutnya komponen organik media BHI sehingga nilai OD kelompok NaOCl menjadi rendah.

Daya antimikroba klorheksidin 1% terhadap pertumbuhan *E. faecalis* lebih besar daripada klorheksidin 0,2%. Hal ini karena klorheksidin bersifat bakterisid pada konsentrasi tinggi 2% dan bersifat bakteriostatik pada konsentrasi rendah 0,2%.

Dengan demikian hipotesa pertama terbukti bahwa air berozone mempunyai daya antimikroba terhadap pertumbuhan bakteri *E. faecalis*. Sedangkan hipotesa yang kedua tidak terbukti karena daya antimikroba NaOCl 5,25%, NaOCl 2,5% dan klorheksidin 1% lebih besar daripada daya antimikroba air berozone. Namun daya antimikroba air berozone sama dengan daya antimikroba klorheksidin 0,2% dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. faecalis*.

Kelemahan penelitian ini adalah cara penghitungan bakteri adalah secara tidak langsung sehingga bila sifat bahan antimikroba mempengaruhi nilai OD

menjadi lebih kecil maka yang terlihat adalah hasil daya antimikroba bahan tersebut lebih baik. Bila penghitungan bakteri dilakukan secara langsung yaitu menghitung bakteri yang hidup, maka akan diketahui pasti daya antimikroba suatu bahan karena memang kemampuannya menghilangkan bakteri. Kelemahan lain adalah media BHI yang digunakan merupakan bahan organik sehingga dapat mempengaruhi daya kerja air berozone.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Air berozone 24ppm mempunyai daya antimikroba terhadap pertumbuhan *E. faecalis*
2. Daya antimikroba air berozone lebih kecil dari daya antimikroba NaOCL 5,25%, NaOCl 2,5% dan klorheksidin 1% dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. faecalis*.
3. Daya antimikroba air berozone sama dengan daya antimikroba klorheksidin 0,2% dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. faecalis*.

Saran

1. Perlu penelitian lebih lanjut menggunakan metode *plate count* untuk menghitung jumlah bakteri
2. Perlu penelitian lebih lanjut menggunakan alat generator ozon yang kemampuan menghasilkan gas ozon lebih besar agar konsentrasi yang dihasilkan dapat lebih besar dan lebih stabil.

DAFTAR PUSTAKA

1. Huth KC, Quirling M, Maier S, Kamereck K, Alkhayer M, Paschos E, Welsch U, Miethke, Brand K, Hickel R . Effectiveness of ozone against endodontopathogenic microorganism in a root canal biofilm model. *Int Endod J* 2009;42:3-13
2. Cardoso MG, Oliveira LD, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Effectiveness of ozonated water on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* and endotoxins in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105:e85-e91
3. Lamley P, Nick A, Tomson O. *Practical Clinical Endodontics*. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2006: 1-4
4. Kaufman B, Spångberg L, Barry J, Fouad AF. *Enterococcus Spp* in endodontically treated teeth with and without periradicular lesions. *J Endod* 2005; 31:851-6
5. Schmeister JF, Liebenow AL, Braun G, Wittmer A, Hellwig E, Al-Ahmad A. Detection and eradication of microorganism in root filled teeth associated with periradicular lesion: An vivo study. *J Endod* 2007;33:536-40
6. Peciuliene V, Maneliene R, Balcikonyte E, Drukteinis S, Rutkunas V. Microorganisms in root canal infections: a review. *Stomatolgija, Baltic Dental and Maxillofacial Journal* 2008;10:4-9
7. Gomes BPFA, Ferraz CCR, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza FJ. In vitro antimicrobial activity of several concentration of sodium hypochlorite and chlorhexidin gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2001;34:424-8
8. Vianna ME, Gomes BPFA, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, de Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidin and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97:79-84
9. Cabral CT, Fernandes MH. In vitro comparison of chlorhexidine and povidone iodine on the long term proliferation and functional activity of human alveolar bone cells. *Clin Oral Invest* 2007;11:155-64
10. Nagayoshi M, Kotamura C, Fukuizumi T, Nishihara T, Terashita M. Antimicrobial effects of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *J Endod* 2004; 30:778-81
11. Huth KC, Jacob FM, Saugel B, Cappelo C, Paschos E, Hollweck R, Hickel R, Brand K. Effect of ozone on oral cell compared with establish antimicrobials. *Eur J Oral Sci* 2006;114:435-40

12. Stubinger S, Sader R, Filipi A. The use of ozone in dentistry and maxillofacial surgery: a review. *Quintessence Int* 2008;37:353-9
13. Nogales CG, Ferrari PH, Kantorovich EO, Lage-Marques JL. Ozone therapy in medicine and dentistry. *Journal of Contemporary Dental Practice* 2008;4:1-8
14. Limeback H, Azarpazhooh A. The Application of ozone in dentistry: a systematic review of literature. *J Dent* 2008;36:104-16
15. Hems RS, Gulabivala Y, Ng YL, Ready D, Spratt DA. An in vitro evaluation of the ability of ozone to kill a strain of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2005;38:22-9
16. Ibrahim NZ, Abdullah M. Antimicrobial evaluation of sodium hypochlorite and ozonated water on *E. faecalis* biofilm. *Annals of Dentistry, University of Malaya* 2008;15:20-26
17. Siqueira JF, Rocas IN. Endodontic microbiology. In: Torabinejad M, Walton RE (Eds). *Principles and Practice of Endodontics*, 4th ed. St. Louis: Saunders, 2009:40-46
18. Pirani C, Bertacci A, Cavrini F, Foschi F, Acquaviva GL, Prati C, Sambri V. Recovery of *Enterococcus faecalis* in root canal lumen of patients with primary and secondary endodontic lesions. *New Microbiologica* 2008;31:235-40
19. Soerono Akbar. Strategi preparasi saluran akar. *Endodontologi, kumpulan naskah 1991-2003*. Jakarta: Hafizh; 2003: 155
20. Walton RE. Access preparation and length determination. In: Walton RE, Torabinejad M (Eds). *Principles and Practice of Endodontics*, 3th ed. St. Louis: Saunders, 2002:183-7
21. Guttmann JL, Witherspoon DE. Obturation of the cleaned and shaped root canal system. In: Cohen S, Burns RC (Eds). *Pathways of the Pulp*, 8th ed. St. Louis: Mosby, 2002: 293-8
22. Portenier I, Waltimo TMT, Haapasalo M. *Enterococcus faecalis* the root canal survivor and 'star' in post treatment disease. *Endodontic Topics* 2003;6:135-59
23. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: Its role in root canal treatment, failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 2006;32:93-8
24. Nisengard RJ, Newman MG. *Oral Microbiology and Immunology*, 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1994: 47- , 307-

25. Samaranayake LP. *Essential Microbiology for Dentistry*, 2nd ed. London: Churchill Livingstone, 2000: 5-9
26. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9th ed. Philadelphia: William & Wilkins, 1994: 528,538
27. Diambil dari <http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguid/unit1/prostruct/diseases/enterococcus/images/u1fig9b.jpg>. Diakses tanggal 23 Februari 2010
28. McHugh CP, Zhang P, Michalek S, Eleazer D. pH required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro. *J Endod* 2004;30 :218-219
29. Sundqvist G, Fidgor D. Life as an endodontic pathogen. Ecological difference between the untreated and root-filled root canals. *Endodontic Topics* 2003;6:3-28
30. Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15:308-20
31. Fidgor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth, and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:234-9
32. Walton RE, Rivera EM. Cleaning and shaping. In: Walton RE, Torabinejad M (Eds). *Principles and Practice of Endodontics*, 3th ed. St. Louis: Saunders, 2002:218-20
33. Gatewood RS. Endodontic materials. *Dent Clin N Am* 2007;51: 695-712
34. El karim I, Kennedy J, Hussey D. The antimicrobial effects of root canal irrigation and medication. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103:560-9
35. Estrela C, Estrela CRA, Barbin EL, Spanó JC, Marchésan M, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J* 2002;13:113-7
36. Haapasalo M, Endal U, Zandi H, Coil JM. Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. *Endodontic Topics* 2005;10:77-102
37. Berber VB, Gomes BP, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CC, Zaia AA, de Souza-Filho FJ. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *Int Endod J* 2006; 39:10-17
38. Hidalgo E, Bartolome R, Dominguez C. Cytotoxicity mechanisms of sodium hypochlorite in cultured human dermal fibroblasts and its bactericidal effectiveness. *Chemico-Biological Interactions* 2002;139:265-82

39. Hulsmann M, Hahn W. Complication during root canal irrigation-literature review and case report. *Int Endod J* 2000;33:186-93
40. Sen BK, Turk BT. An update on chlorhexidine in endodontics. *ENDO (Lond Engl)* 2009;3:87-99
41. Ferraz CC, Figueiredo de Almeida Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod* 2001;27:452-5
42. Oncağ O, Hosgör M, Hilmioğlu S, Zekioğlu O, Eronat C, Burhanoğlu D. Comparison of antibacterial and toxic effect of various root canal irrigant. *Int Endod J* 2003;36:423-32
43. Dametto FR, Ferraz CC, de Almeida Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;99:768-72
44. Kuruvilla JR, Kamath MP. Antimicrobial activity of 2,5% sodium hypochlorite and 0,2% chlorhexidine gluconate separately and combined as endodontic irrigants. *J Endod* 1998;24:472-76
45. Basrani B, Manek S, Sodhi RN, Fillery E, Manzur A. Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. *J Endod* 2007;33:966-9
46. Chang YC, Huang FM, Tai KW, Chou MY. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human ligament periodontal cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;92:446-50
47. Cabral CT, Fernandes MH. In vitro comparison of chlorhexidine and povidone iodine on the long term proliferation and functional activity of human alveolar bone cells. *Clin Oral Invest* 2007;11:155-64
48. Estrela C, Estrela CRA, Decurcio DA, Holland ACB, Silva JA. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hipohlorite and chlorhexidine in infected human root canals. *Int Endod J* 2007;40:85-93
49. Dillon B, Wiesenborn D, Wolf-Hall C, Manthey F. Development and evaluation of ozonated water system for antimicrobial treatment of durum wheat. *J Food Science* 2009;74:E396-E403
50. Nagayoshi M, Fukuizumi T, Kitamura C, Yano J, Terashita M, Nishihara T. Efficacy of ozone on survival and permeability of oral microorganisms. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:240-6
51. Somerville GA, Beres SB, Fitzgerald JR, DeLeo FR, Cole RL, Hoff JS, Musser JM. In Vitro Serial Passage of *Staphylococcus aureus*: Changes in

physiology, virulence factor production, and *agr* nucleotide sequence. *J Bacteriol* 2002;184:1430-7

52. Restiano L, Frampton EW, Hemphill JB, Palnikar P. Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. *Applied Environmental Microbiology* 1995;61:3471-5
53. Estrela C, Ribeiro RG, Estrela CR, Pecora JD, Sousa-Neto MD. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Braz Dent J* 2003;14:58-62