

Data penelitian ini akan di publikasi pada jurnal internasional, mohon untuk tidak di repostorika terlebih dahulu.

TTD

PENGARUH PENGGUNAAN LARUTAN IRIGASI CHLORHEXIDINE 0,2% YANG DIKOMBINASI DENGAN HYDROGEN PEROXIDE 3% TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*

Yasinta Pangastuti¹, Arya Adiningrat²

¹ Dentistry Student, Faculty of Medicine and Health Science UMY

² Oral Science Department, Faculty of Medicine and Health Science UMY

Yasintapangastuti27@gmail.com

ABSTRAK

Background: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is facultative anaerobic bacteria, gram-negative attributed as a periodontal disease etiology. Application of an irrigation solution that has an antimicrobial effect can be used as an additional treatment. The irrigation solution used is chlorhexidine and hydrogen peroxide.

Purpose: This aims to determine the effect of using *chlorhexidine* 0.2% irrigation solution combined with *hydrogen peroxide* 3% in the growth of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Method: The type of research used is pure laboratory experimental. The method used is the diffusion of wells with the media of blood agar plate followed by the measurement of bacterial inhibition zone with sliding caliper. The irrigation solutions used in the study were *chlorhexidine* 0.2% and *chlorhexidine* 0.2% combined with *hydrogen peroxide* 3%.

Result: Both tested irrigation solutions can inhibit the growth of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* bacteria. The most effective irrigation solution in inhibiting bacterial growth is *chlorhexidine* 0.2%. **Conclusion:** The use of a single solution showed a more effective result than the solution applied in combination.

Keywords: *chlorhexidine* 0.2%, *hydrogen peroxide* 3%, The bacterial inhibition zone.

INTISARI

Latar Belakang: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* merupakan bakteri fakultatif anaerob, gram negatif yang dikaitkan sebagai etiologi penyakit periodontal. Aplikasi larutan irigasi yang memiliki efek antimikroba dapat digunakan sebagai perawatan tambahan. Larutan irigasi yang digunakan adalah larutan *chlorhexidine* dan *hydrogen peroxide*. **Tujuan Penelitian:** Untuk mengetahui pengaruh penggunaan larutan irigasi *chlorhexidine* 0,2% yang dikombinasi dengan *hydrogen peroxide* 3% terhadap pertumbuhan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Metode Penelitian:** Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimental murni laboratoris. Metode yang digunakan adalah difusi sumuran dengan media blood agar plate yang dilanjutkan dengan pengukuran zona hambat bakteri dengan *sliding caliper*. Larutan irigasi yang digunakan dalam penelitian adalah *Chlorhexidine* 0,2% dan *Chlorhexidine* 0,2% yang dikombinasi dengan *hydrogen peroxide* 3% . **Hasil Penelitian:** Kedua larutan irigasi yang diujikan dapat menghambat pertumbuhan bakteri *aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Larutan irigasi yang paling efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri adalah *chlorhexidine* 0,2 % . **Kesimpulan:** Penggunaan larutan tunggal menunjukkan hasil yang lebih efektif dibandingkan larutan yang diaplikasikan secara kombinasi.

Kata kunci: *Chlorhexidine* 0,2%, *Hydrogen peroxide* 3%, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, Zona Hambat bakteri

Pendahuluan

Masalah periodontal telah dianggap menjadi masalah kesehatan utama⁸. Dalam beberapa tahun terakhir, etiologi periodontitis telah berkembang. Periodontitis adalah penyakit inflamasi pada jaringan pendukung gigi yang disebabkan oleh mikroorganisme tertentu atau kelompok mikroorganisme, yang mengakibatkan kerusakan ligamen periodontal dan tulang alveolar dengan meningkatnya formasi kedalaman poket, resesi, atau keduanya. Mikroorganisme

patogen tertentu terbukti terkait dengan berbagai bentuk penyakit periodontal, serta kecepatan perkembangan dari bakteri⁷.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans sebelumnya dikenal dengan *Actinobacillus actinomycetemcomitans* adalah bakteri gram negatif yang bersifat fakultatif anaerob, berbentuk kokobasil dan *non-motile*³, salah satu bakteri pathogen periodontal paling kuat⁴ dan dapat ditemukan pada mukosa oral, plak pada gigi dan juga pada poket periodontal¹⁴. Berbagai faktor virulensi dapat diproduksi oleh *aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang memiliki peran dalam patogenesis penyakit periodontal. Faktor-faktor ini memiliki potensi untuk menghancurkan jaringan periodontal secara langsung pada jaringan periodontal adalah *collagenase* bakteri yang menghancurkan jaringan ikat pada gingiva. Faktor lain adalah fibroblas yang akan menghambat perbaikan jaringan¹⁰.

Irigasi pada poket periodontal dengan agen antimikroba digunakan untuk mempengaruhi *microfloral* subgingival dan untuk meningkatkan kembali kondisi periodontal¹⁰. Larutan irigasi yang umumnya digunakan adalah salin dan chlorhexidine. Namun semakin berkembangnya zaman telah ditemukan bahan lainnya yang dapat digunakan sebagai larutan irigasi seperti *hydrogen peroxide*, *ozone*, *povidone iodine*, dan *tetracycline HCl*¹⁵.

Chlorhexidine memiliki spektrum yang luas, kurangnya efek samping yang serius, dan kurangnya toksisitas, dan biasanya dapat digunakan sebagai obat kumur dalam kedokteran gigi¹². Efektif dalam menghambat pertumbuhan maupun membunuh bakteri gram positif dan gram negatif. Molekul dari *chlorhexidine* memiliki muatan positif (kation) dan sebagian besar muatan molekul bakteri adalah negatif (anion). Hal ini dapat menyebabkan perlekatan yang kuat dari *chlorhexidine* pada membran sel bakteri, sehingga akan menyebabkan perubahan pada permeabilitas membran sel bakteri dan keluarnya sitoplasma sel dari dalam sel sehingga menyebabkan kematian bakteri¹.

Hydrogen peroxide merupakan agen antimikroba yang telah digunakan sebagai larutan irigasi untuk jangka waktu yang lama. Efektif melawan bakteri, virus dan ragi⁶. Sifat antibakteri *hydrogen peroxide* dapat dilihat dalam mengeliminasi gram positif dan gram negatif pada bakteri. *Hydrogen peroxide*

jika terkena senyawa lain, akan berubah dengan cepat menjadi air dan oksigen. Oksigen dilepaskan dalam bentuk radikal bebas dan melalui proses oksidasi dapat menghancurkan mikroorganisme anaerob¹³. Radikal hidroksil yang terbentuk akan menjadi oksidan yang kuat dan dapat bereaksi dengan mudah dengan makromolekul seperti membran lipid dan DNA sehingga mengakibatkan kematian bakteri¹¹.

Penelitian ini mengujikan larutan irigasi *chlorhexidine* 0,2 % yang dikombinasi dengan *hydrogen peroxide* 3%. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh larutan irigasi *chlorhexidine* 0,2% dan *chlorhexidine* 0,2% yang dikombinasikan dengan *hydrogen peroxide* 3% terhadap pertumbuhan bakteri *aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Metode

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental murni laboratoris tentang pengaruh larutan irigasi *chlorhexidine* 0,2% dan *chlorhexidine* 0,2% yang dikombinasi dengan *hydrogen peroxide* 3% terhadap pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November-Februari 2018.

Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang diperoleh dari biakan yang tersedia di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada. Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan cara mengambil beberapa koloni bakteri dengan menggunakan ose steril lalu dimasukkan ke dalam 5 ml media *Tryptose Phosphate Broth* dimasukkan kedalam *anaerobic jar*, inkubasi didalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C.

Dalam penelitian ini percobaan dilakukan dengan memberi perlakuan minimal 6 kali pengulangan. Sehingga besar sampel dalam penelitian ini sebanyak 18 sampel, yang terbagi menjadi 3 kelompok perlakuan. Suspensi bakteri diambil menggunakan mikropipet, setelah itu dituangkan pada permukaan media *blood agar* pada setiap cawan petri. Pipet pasteur modifikasi digunakan untuk meratakan bakteri yang telah disuspensi pada permukaan media *blood agar*, dan

dimasukkan ke dalam *anaerobic jar*, inkubasi selama 24jam pada suhu 37°C. Cawan petri dibagi menjadi 3 bagian yang akan dibuat lubang sumuran. Lubang sumuran dengan diameter 6 mm diaplikasikan dengan larutan uji *chlorhexidine* 0,2% dikombinasi dengan *hydrogen peroxide* 3%, *chlorhexidine* 0,2% dan *aquades* steril sebagai kontrol negatif. Cawan petri yang sudah berisi bakteri uji dan larutan irigasi dimasukkan ke dalam *anaerobic jar*, dilanjutkan proses inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Cara membaca hasil zona radikal adalah dengan mengukur daerah disekitar disk yang sama sekali tidak ditemukan pertumbuhan bakteri.

Data yang diperoleh selanjutnya akan dibandingkan dalam bentuk tabel dan kurva. Analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Package for the Social Science*) kemudian dilakukan uji normalitas dengan *Shapiro-wilk*, uji hipotesis dengan menggunakan *One Way ANOVA*, untuk menentukan perbedaan dari setiap masing-masing kelompok uji dilanjutkan dengan melakukan uji *Multiple Comparison* menggunakan *Dunnnett T (2-sided)*.

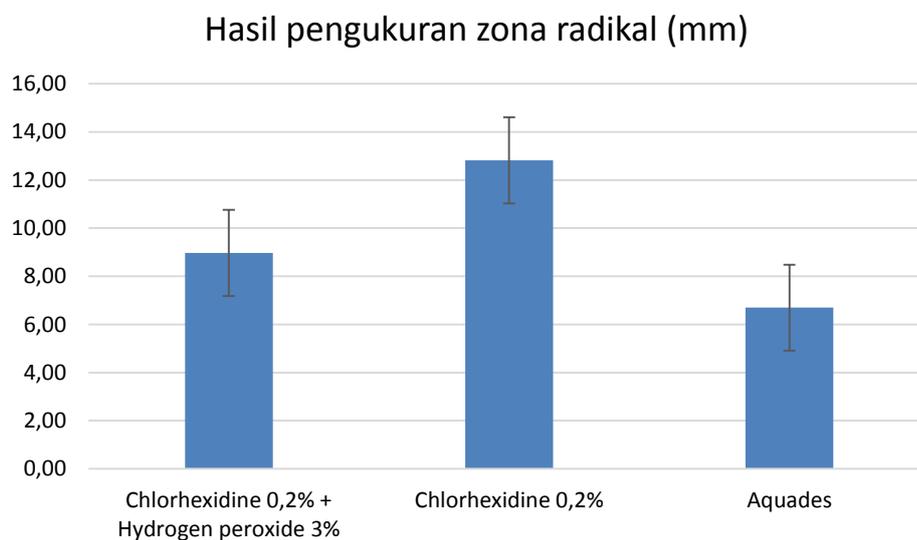
Hasil

Penelitian ini menggunakan metode difusi dan pengukuran zona radikal dengan menggunakan *sliding caliper* dengan ketelitian 0,01 mm. Metode tersebut digunakan untuk mengetahui zona hambat pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Hasil penelitian dapat dilihat pada tabel dan gambar berikut.

Hasil Pengukuran Zona Radikal			
Plate	<i>Chlorhexidine</i> 0,2% + <i>Hydrogen Peroxide</i> 3%	<i>Chlorhexidine</i> 0,2%	Kontrol Negatif (<i>Aquades</i> steril)
1	9,23 mm	13,00 mm	6,60 mm
2	8,96 mm	13,56 mm	7,20 mm
3	9,23 mm	12,36 mm	6,63 mm
4	8,53 mm	13,23 mm	7,16 mm
5	8,56 mm	12,56 mm	6,00 mm
6	9,30 mm	12,20 mm	6,60 mm
Rata-rata	8.96 mm	12.81 mm	6.69 mm
Std. Dev	0,34810	0,53135	0,44192

Tabel 1. Hasil pengukuran zona radikal

Gambar 1. Hasil rata-rata pengukuran zona hambat



Berdasarkan tabel dan gambar 1 di atas dapat disimpulkan bahwa larutan irigasi *chlorhexidine* 0,2% memiliki rata-rata zona radikal lebih besar dibandingkan dengan perlakuan *chlorhexidine* 0,2% dikombinasi dengan *hydrogen peroxide* 3% terhadap pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Uji normalitas pada penelitian ini menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Hasil uji normalitas dapat dilihat dalam tabel di bawah ini:

Tabel 1. Hasil uji normalitas *Shapiro-Wilk*

Kelompok	Sig	Keterangan
<i>Chlorhexidine</i> 0,2% + <i>Hydrogen Peroxide</i> 3%	0,97	p>0,05
<i>Chlorhexidine</i> 0,2%	0,733	p>0,05
Aquades Steril	0,310	p>0,05

Berdasarkan hasil diatas pada tabel 1 menunjukkan nilai signifikansi (p) sebesar 0,97 untuk kelompok perlakuan kombinasi (*Chlorhexidine* 0,2% +

Hydrogen Peroxide 3%), 0,733 untuk kelompok perlakuan tunggal (*chlorhexidine* 0,2%) dan 0,310 untuk kelompok perlakuan aquades steril sehingga distribusi data uji normalitas dikatakan normal.

Tabel 2. Hasil uji homogenitas *Levene*

<i>Levene test</i>	Nilai p	Keterangan
Pertumbuhan bakteri <i>Aggregatibacter</i> <i>actinomycetemcomitans</i>	0,425	Data homogen

Tabel 2 uji homogenitas diatas menunjukkan hasil signifikansi (p) sebesar 0,425 ($P > 0,05$) sehingga secara keseluruhan data pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dikatakan homogen.

Tabel 3. Hasil uji parametrik *One Way ANOVA*

	Sum Of Square	Df	Mean Square	F	Sig
Between Groups	114,860	2	57,430		
Within Groups	2,994	15	0,200	287,720	0,000
Total	117,854	17			

Berdasarkan tabel 3 diatas menunjukkan nilai probabilitas signifikansi (p) sebesar 0,000 ($p < 0,05$) sehingga hipotesis diterima yang artinya terdapat perbedaan yang signifikan pada kelompok perlakuan. Serta variabel bebas terbukti berpengaruh secara signifikan terhadap variabel terikat.

Data diatas didapatkan hasil Df 1 sebesar 2 dan Df 2 sebesar 15, sehingga F tabel didapatkan hasil 3,68. Dari angka tersebut menunjukkan posisi F hitung lebih besar dibandingkan dengan F tabel yang artinya H_0 ditolak sehingga kedua larutan irigasi terbukti berpengaruh secara signifikan terhadap pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Selanjutnya dilakukan uji *Multiple Comparison* menggunakan *Dunnnett t (2-sided)*. Hasil uji pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 4 berikut:

Tabel 4. Uji *Dunnnett t (2- sided)*

	Treatment		Sig	Lower Bound	Upper Bound
Dunnnett t (2-sided)	A	C	0,000	1,6408	2,8992
	B	C	0,000	5,4908	6,7492

Keterangan tabel 4 :

A = *Chlorhexidine 2% + Hydrogen peroxide 3%*

B = *Chlorhexidine 2%*

C = Aquades steril (Kontrol negatif)

Pada tabel hasil uji *Dunnnett t (2- sided)* dengan menunjukkan ketepatan nilai signifikansi (p) sebesar 0,000 dengan mean difference nilai $-/+1sd$ sebesar 1,6408 dan 2,8992 untuk perlakuan kelompok A terhadap kelompok C, hal ini menunjukkan bahwa perlakuan B-C lebih besar dibandingkan A-C.

Pembahasan

Hasil penelitian ini menunjukkan terdapat pengaruh pada larutan *chlorhexidine* 0,2% dan *chlorhexidine* 0,2% yang dikombinasi dengan *hydrogen peroxide* 3% terhadap pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Kemampuan bahan larutan tersebut pernah dilakukan pada penelitian terdahulu secara klinis oleh Jhingta dkk., yang menyatakan bahwa larutan *Chlorhexidine* 0,2% dapat dikombinasikan dengan larutan *hydrogen peroxide*².

Kondisi ketika kedua senyawa tersebut diberikan dalam bentuk campuran ternyata memberikan hasil yang dapat mengurangi efektivitas dari *chlorhexidine* dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Mekanisme kerja *chlorhexidine* dapat menyebabkan kerusakan pada lapisan luar sel bakteri, namun kerusakan ini tidak cukup untuk menyebabkan kematian sel atau lisisnya sel. *Chlorhexidine* akan melintasi dinding sel atau membran luar, melalui proses difusi pasif, sehingga

dibutuhkan adanya kontak langsung antara *chlorhexidine* dengan bakteri⁶. Ketika hydrogen peroxide bereaksi dengan oksigen, akan membentuk radikal bebas hidroksil¹³. Radikal hidroksil menjadi oksidan yang kuat dan dapat bereaksi dengan mudah dengan makromolekul seperti membran lipid dan DNA sehingga mengakibatkan kematian bakteri¹¹. Model pengujian yang peneliti lakukan pada penelitian ini dengan menggunakan model sumuran pada media *blood agar*. Dari hasil zona pada larutan kombinasi peneliti melihat adanya reaksi langsung berupa munculnya buih yang berasal dari hydrogen peroxide disekitar lubang sumuran dan menghasilkan area berupa zona hambat bakteri. Zona yang terbentuk tersebut merupakan hasil dari oksidasi yang membunuh bakteri disekitar lubang sumuran. Reaksi dari *hydrogen peroxide* yang melepaskan oksigen menimbulkan reaksi yang cepat, berbeda dengan *chlorhexidine* yang bekerja secara difusi pasif sehingga membutuhkan waktu dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Hal tersebut menyebabkan area zona hambat pertumbuhan bakteri yang ditunjukkan pada larutan kombinasi lebih kecil dibandingkan dengan larutan tunggal. Daerah zona hambat berupa buih yang dihasilkan oleh *hydrogen peroxide* dimungkinkan dapat menghambat laju dari aliran *chlorhexidine* sehingga larutan tersebut tidak dapat berkontak langsung dengan bakteri. Interaksi yang terjadi antara *chlorhexidine* dengan *hydrogen peroxide* jika diberikan secara bersamaan dalam bentuk campuran dimungkinkan akan mengurangi daya penetrasi difusi pasif dari *chlorhexidine* dalam pencapaiannya untuk bisa ke dinding sel bakteri. Hal ini yang membuat larutan tunggal dalam penelitian ini lebih efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah diperoleh maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Larutan tunggal dan larutan kombinasi campuran memiliki efek dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.
2. Penggunaan larutan tunggal menunjukkan hasil yang lebih optimal menghambat pertumbuhan bakteri dibandingkan larutan yang diaplikasi secara kombinasi campuran.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan yang sama dengan aplikasi larutan kombinasi satu-persatu dan diberi jeda waktu tiap diberikan perlakuan sehingga larutan dapat bekerja dengan maksimal.

Daftar pustaka

1. Cheung HY, Wong MM, Cheung SH, Liang LY, Lam YW, Chiu SK., 2012. Differential actions of chlorhexidine on the cell wall of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Public Library of Science One*. 7(5), 1-11.
2. Jhingta, P., Bhardwaj, A., Sharma, D., Kumar, N., Bhardwaj, V. K., & Vaid, S., 2013. Effect of Hydrogen Peroxide Mouthwash as an Adjunct to Chlorhexidine on Stains and Plaque. *Journal Of Indian Society Of Periodontology*, 17(4), 449-453.
3. Kesic, L., Milasin, J., Igetic, M., & Obradovic, R., 2008. Microbial Etiology of Periodontal Disease – Mini Review. *Medicine and Biology*, 15(1), 1-6.
4. Malik, R., Changela, R., Keishan, P., Gugnani, S., & Bali, D., 2015. Virulence factors of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* - A status update. *Journal of the international clinical dental research organization*, 7(2), 137-145.
5. McDonnell, G., Russel, D., Antiseptic and Desinfectants; Activity, Actions and Resistance., 1999. *Clinical microbiology*. 12(1); 147-149.
6. Mirhadi, H., Abbaszadegan, A., Ranjbar, M.A., Azar, M.R., Geramizadeh, B., Torabi, sh., Sadat, Aleyasin Z., Gholami, A., 2015. Antibacterial and Toxic Effect of Hydrogen Peroxide Combined with Different Concentrations of Chlorhexidine in Comparison with Sodium Hypochlorite. *Dent Shiraz Univ Med Sci*. 16(4): 349-355.
7. Perayil, J., Menon, K. S., Biswas, R., Fenol, A., & Vylpillil, R., 2016. Comparison of the efficacy of subgingival irrigation with 2% povidone-iodine and tetracycline HCl in subjects with chronic moderate

- periodontitis: *A clinico microbiological study. Dental Research Journal*, 13(2), 98-109.
8. Rashed, Hazem T., 2016. Evaluation of the effect of hydrogen peroxide as a mouthwash in comparison with chlorhexidine in chronic periodontitis patients: A clinical study. *Journal Of International Society Of Preventive & Community Dentistry*, 6(3), 206-212.
 9. Ravishankar, P. L., Venugopal, K., & Nadkerny, P., 2015. Effect of Tetracycline Hydrochloride and Spiramycin Sub Gingival Irrigation with Pulsated Jet Irrigator in Chronic Periodontitis Patients: A Clinical Study. *Journal Of International Oral Health*, 7(7), 102-107.
 10. Saranyan, R., Manovijay, B., Babu, G. B., Rajasekar, Nithya, I., & Anitha, A., 2017. Biochemical Identification of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in an Indian Sample with Aggressive Periodontitis. *Journal of Advances in Microbiology*. 7(1): 1-8.
 11. Shahriari, S., Mohammadi, Z., Yousefi, R., 2010, Effect of hydrogen peroxide on the antibacterial substantivity of chlorhexidine. *International journal of dentistry*. 2010; 2010: 946384
 12. Shewale, A., Gattani, D., Bhasin, M. T., Bhatia, N., & Agarwal., 2016. Adjunctive Role of Supra- and Subgingival irrigation in Periodontal therapy. *International Journal Of Pharma Sciences And Research*, 7(3), 152-159.
 13. Silhacek, K. J., & Taake, K. R., 2004. Sodium Bicarbonate and Hydrogen Peroxide: *The Effect on the Growth of Streptococcus mutans*. *Journal Dental Hygiene*, 79(4), 1-7.
 14. Sriraman, P., Mohanraj, R., & Neelakantan, P., 2014. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in Periodontal Disease. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(2), 406-409.
 15. Tariq, M., Iqbal, Z. & Sahni, J. K., 2012, Treatment modalities and evaluation models for periodontitis. *International journal of pharmaceutical investigation*. 2(3): 106-122.

