

**PENGARUH PELAPISAN KITOSAN DARI EKSTRAK TULANG SOTONG
(*SEPIA SP.*) TERHADAP PEMBENTUKAN BIOFILM *AGGREGATIBACTER
ACTINOMYCETEMCOMITANS* PADA PERMUKAAN *MINISCREW*
ORTODONTI**



NURNABILLA SYFADEWI ATTAYA

J011211066



PROGAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER GIGI

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2024

Optimized using
trial version
www.balesio.com

PENGARUH PELAPISAN KITOSAN DARI EKSTRAK TULANG SOTONG (*SEPIA SP.*) TERHADAP PEMBENTUKAN BIOFILM *AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS* PADA PERMUKAAN *MINISCREW* ORTODONTI

Nurnabilla Syfadewi Attaya

J011211066



PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER GIGI

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2024

PENGARUH PELAPISAN KITOSAN DARI EKSTRAK TULANG SOTONG (*SEPIA SP.*) TERHADAP PEMBENTUKAN BIOFILM *AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS* PADA PERMUKAAN *MINISCREW* ORTODONTI

Nurnabilla Syfadewi Attaya

J011211066

Skripsi

Diajukan kepada Universitas Hasanuddin Sebagai Salah Satu Syarat Untuk
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Gigi

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER GIGI

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2024



SKRIPSI
**PENGARUH PELAPISAN KITOSAN DARI EKSTRAK TULANG SOTONG (*SEPIA*
SP.) TERHADAP PEMBENTUKAN BIOFILM *AGGREGATIBACTER*
ACTINOMYCETEMCOMITANS PADA PERMUKAAN *MINISCREW* ORTODONTI**

NURNABILLA SYFADEWI ATTAYA

J011211066

Skripsi,

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Sarjana Pendidikan Dokter Gigi dan
dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Program Studi Pendidikan Dokter Gigi

Departemen Ortodonti

Fakultas Kedokteran Gigi

Universitas Hasanuddin

Makassar

Mengesahkan:

Pembimbing tugas akhir,



Optimized using
trial version
www.balesio.com

Mengetahui:

Ketua Program Studi,



Muhammad Iqbal, drg., Ph.D Sp.Pro.

Subsp. PKIKG(K)

NIP 198010212009121002

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, skripsi berjudul "Pengaruh pelapisan kitosan dari ekstrak tulang sotong (*sepia sp.*) Terhadap pembentukan biofilm *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* pada permukaan *miniscrew* ortodonti" adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing Karima Qurnia Mansjur, drg., Ph.D. Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka skripsi ini. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku. Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa skripsi ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 28 Oktober 2024



Nurnabilla Syfadewi Attaya

NIM J011211066



Optimized using
trial version
www.balesio.com

UCAPAN TERIMA KASIH

Segala puji dan syukur penulis panjatkan ke Allah SWT atas berkat dan karunia-Nya yang senantiasa memberkati dan memberikan kelancaran serta kemampuan pada penulis sehingga skripsi yang berjudul “Pengaruh Pelapisan Kitosan Dari Ekstrak Tulang Sotong (*Sepia Sp.*) Terhadap Pembentukan Biofilm *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* Pada Permukaan *Miniscrew* Ortodonti” dapat selesai tepat pada waktunya. Penulis menyadari bahwa engan adanya dukungan, doa, serta bantuan dari berbagai pihak, skripsi ini dapat selesai dengan baik. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati penulis ingin mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. **drg. Irfan Sugianto, M.Med.Ed., Ph.D.** selaku dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin beserta seluruh sivitas akademik atas bantuan selama penulis menempuh Pendidikan
2. **Dr. drg. Arni Irawaty Djais Sp. Perio. (K)** selaku dosen pembimbing akademik.
3. **Karima Qurnia Mansjur, drg., Ph.D** selaku dosen pembimbing skripsi yang telah meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran selama penulis melakukan penelitian dan penyusunan skripsi hingga selesai.
4. **Rika Damayanti Syarif, drg., M.Kes.** dan **Prof. Mansjur Nasir, drg., Ph.D.** selaku dosen penguji skripsi yang telah meluangkan waktu, memberikan saran dan arahan kepada penulis selama penyusunan skripsi.
5. Ayahanda **Marzuki Rachmat** dan Ibunda **Lukmi Andriyani**, selaku orang tua penulis yang tiada henti memberikan dukungan doa dan segalanya sehingga setiap jalan yang ditempuh selalu diberkati oleh Allah SWT.
6. **Muh. Chaerul Gunawan** yang menjadi penyemangat penulis. Terimakasih atas bantuan, dukungan dan kebahagiaan yang telah diberikan kepada penulis sehingga penulis dapat selalu termotivasi untuk menyelesaikan skripsi. Terimakasih selalu ada menemani dan menjadi tempat aman penulis untuk berkeluh kesah selama proses pengerjaan skripsi.
7. Seluruh sahabat yang bernama **Wulan, Ai, Kesa, Jessica, Bintang, Lia, Maya, Warda, Gita, Farah, dan Autri**. Terimakasih atas canda tawa yang membahagiakan dan menjadi keluarga baru



ABSTRAK

NURNABILLA SYFADEWI ATTAYA. **Pengaruh pelapisan kitosan dari ekstrak tulang sotong (*sepia sp.*) Terhadap pembentukan biofilm *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* pada permukaan *miniscrew* ortodonti** (dibimbing oleh Karima Qurnia Mansjur, drg., Ph.D.)

Latar belakang: *Miniscrew* ortodonti merupakan salah satu komponen penting dalam perawatan ortodonti, dimana *miniscrew* ini berupa sekrup berukuran kecil yang ditanam ke dalam rahang. Dalam beberapa kasus, *miniscrew* kadang mengalami kegagalan diantaranya oleh karena infeksi. Hal ini diakibatkan oleh kolonisasi bakteri seperti *aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang menjadi penyebab periimplantitis. Pendekatan terbaru untuk mengatasi kolonisasi bakteri adalah dengan menggunakan lapisan antibakteri alami yang berasal dari biota laut. Sotong (*Sepia sp.*) merupakan salah satu komoditas perikanan yang banyak dimanfaatkan oleh masyarakat. Tulang sotong mengandung kitin yang dapat diekstraksi menjadi kitosan. Kitosan berpotensi untuk dijadikan sebagai bahan antibakteri, karena mengandung enzim lisozim dan gugus aminopolisakarida yang mampu menghambat pertumbuhan mikroba. Kitosan juga merupakan biopolimer yang bersifat hidrofobik, sehingga kitosan sangat cocok jika digunakan sebagai bahan komposit pembentuk lapisan. **Metode:** Jenis penelitian yang digunakan berupa penelitian eksperimen laboratoris dengan desain penelitian post-test-only-controlled group untuk menentukan pengaruh kitosan dari ekstrak tulang sotong terhadap pertumbuhan bakteri *A. Actinomycetemcomitans*, dengan menggunakan metode difusi sumuran kemudian mengamati zona hambat di sekitar sumuran. **Hasil:** Ekstrak kitosan dari tulang sotong dengan konsentrasi 0.4%, 0.6%, 0.8% menghasilkan zona hambat, yang menunjukkan senyawa tersebut memiliki daya antibakteri terhadap *A. Actinomycetemcomitans*. Zona hambat sudah mulai terbentuk pada konsentrasi 0.4% dengan rerata $16,17 \pm 1,64$. pada konsentrasi 0.8% menunjukkan zona hambat terbesar (selain kontrol positif) dengan rerata $20,99 \pm 3,63$. Hasil tabel menunjukkan semakin besar konsentrasi, maka semakin besar pula zona bening yang terbentuk. **Kesimpulan:** Kitosan dari ekstrak tulang sotong (*sepia sp.*) memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *A. Actinomycetemcomitans* secara in-vitro. Pada konsentrasi kitosan 0.8% menunjukkan memiliki aktivitas antibakteri yang lebih kuat daripada 0.4% dan 0.6%. Semakin tinggi konsentrasi kitosan, maka diameter zona hambat terhadap pertumbuhan bakteri *A. Actinomycetemcomitans* juga semakin besar.

Kata kunci : Kitosan, Miniscrew, Ortodonti, Tulang sotong



ABSTRACT

NURNABILLA SYFADEWI ATTAYA. Effect of chitosan coating from cuttlefish bone extract (sepia sp.) on biofilm formation of *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* on the surface of orthodontic miniscrew (supervised by Karima Qurnia Mansjur, drg., Ph.D.)

Background: Orthodontic miniscrews are one of the important components in orthodontic treatment, which are small screws that are implanted into the jaw. In some cases, miniscrews fail due to infection. This is due to the colonization of bacteria such as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* which causes periimplantitis. A recent approach to overcome bacterial colonization is to use natural antibacterial coatings derived from marine life. Cuttlefish (*Sepia sp.*) is one of the fishery commodities that is widely utilized by the community. Cuttlefish bones contain chitin which can be extracted into chitosan. Chitosan has the potential to be used as an antibacterial material, because it contains lysozyme enzymes and aminopolysaccharide groups that can inhibit microbial growth. Chitosan is also a biopolymer that is hydrophobic, so chitosan is very suitable if used as a layer-forming composite material. **Methods:** The type of research used was laboratory experimental research with a post-test-only-controlled group research design to determine the effect of chitosan from cuttlefish bone extract on the growth of *A. Actinomycetemcomitans* bacteria, using the well diffusion method and then observing the inhibition zone around the well. **Results:** Chitosan extract from cuttlefish bone at concentrations of 0.4%, 0.6%, 0.8% produced zones of inhibition, indicating the compound has antibacterial power against *A. Actinomycetemcomitans*. The inhibition zone has begun to form at a concentration of 0.4% with an average of 16.17 ± 1.64 . at a concentration of 0.8% showed the largest inhibition zone (other than positive control) with an average of 20.99 ± 3.63 . The table results show that the greater the concentration, the greater the clear zone formed. **Conclusion:** Chitosan from cuttlefish bone extract (*sepia sp*) has antibacterial activity against *A. Actinomycetemcomitans* bacteria in-vitro. Chitosan concentration of 0.8% showed stronger antibacterial activity than 0.4% and 0.6%. The higher the chitosan concentration, the greater the diameter of the inhibition zone against the growth of *A. Actinomycetemcomitans* bacteria.

Key word : Chitosan, Miniscrew, Orthodontic, Cuttlefish bone



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGAJUAN SKRIPSI	ii
HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI	iii
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	iv
UCAPAN TERIMA KASIH	v
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I	1
PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	2
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB II	4
METODE PENELITIAN	4
2.1. Jenis Penelitian	4
2.2. Waktu dan Tempat Penelitian	4
2.2.1. Tempat	4
2.2.2. Waktu	4
2.3. Variabel Penelitian	4
2.3.1. Variable Bebas	4
2.3.2. Variabel Terikat	4
2.3.3. Variabel Kendali	4
2.4. Definisi Operasional	4
Jilang Sotong	4
Ibat	4
Sitif	5
Sgatif	5
Smpel penelitian	5



2.5.1. Besar Sampel	5
2.5.2. Kriteria Sampel	5
2.6. Alat dan Bahan Penelitian	6
2.6.1. Alat.....	6
2.6.2. Bahan	6
2.7. Prosedur penelitian	7
2.7.1. Pembuatan Ekstrak Tulang Sotong menjadi Kitosan	7
2.7.2. Pembuatan Ekstrak Tulang Sotong dengan berbagai Konsentrasi	7
2.7.3. Persiapan Bakteri A. Actinomycetemcomitans	7
2.7.4. Pembuatan Lapisan dari Kitosan	7
2.7.5. Uji Antibakteri Metode Difusi Sumuran	8
2.8. Analisis Data	8
2.9. Pembuatan Ekstrak Tulang Sotong Menjadi Kitosan	9
2.10. Uji Antibakteri Metode Difusi Sumuran	10
BAB III.....	11
HASIL DAN PEMBAHASAN.....	11
3.1 Hasil Ekstrak Tulang Sotong (<i>Sepia Sp</i>)	11
3.2 Hasil Uji Aktivasi Antibakteri	11
3.3 Analisis Data.....	15
3.4 Pembahasan.....	17
BAB IV	19
KESIMPULAN DAN SARAN.....	19
4.1 Kesimpulan	19
4.2 Saran	19
DAFTAR PUSTAKA.....	20
LAMPIRAN	21



DAFTAR TABEL

Tabel 3. 1 Hasil pengukuran diameter zona hambat kitosan terhadap pertumbuhan bakteri <i>A. Actinomycetemcomitans</i>	13
Tabel 3. 2 Kategori kekuatan daya hambat.....	14
Tabel 3. 3 Hasil uji statistic zona inhibisi kitosan terhadap bakteri.....	15
Tabel 3. 4 Hasil uji tukey perbedaan rata-rata pada masing-masing kelompok konsentrasi	16
Tabel 3. 5 Hasil uji LSD	16



DAFTAR GAMBAR

Gambar 3. 1 Hasil kitosan dari ekstrak tulang sotong.....	11
Gambar 3. 2 Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri <i>A. Actinomycetemcomitans</i> . (a) pengulangan I (b) pengulangan II (c) pengulangan III (d) pengulangan IV (e) pengulangan V.....	12
Gambar 3. 3 Diagram rerata zona hambat bakteri <i>A. Actinomycetemcomitans</i>	14



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Tugas	22
Lampiran 2 Permohonan Rekomendasi Etik	23
Lampiran 3 Surat Izin Penelitian	24
Lampiran 4 Surat Persetujuan Etik	25
Lampiran 5 Undangan Seminar Proposal dan Seminar Hasil	26
Lampiran 6 Berita Acara	28
Lampiran 7 Kartu Kontrol Skripsi	29
Lampiran 8 Data Penelitian	30
Lampiran 9 Lampiran Kegiatan Penelitian	33
Lampiran 10 Dokumentasi Seminar Hasil	36
Lampiran 11 Daftar Riwayat Hidup	37



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Maloklusi merupakan sebagai kelainan pada gigi atau kelainan pada lengkung gigi di luar variasi dari apa yang dianggap biasa (Devi et al., 2022). Di Indonesia, data Riset Kesehatan Dasar Nasional tahun 2018 melaporkan prevalensi masalah gigi dan mulut adalah 57,6%. Prevalensi maloklusi di Indonesia masih sangat tinggi yaitu sekitar 80% dari jumlah penduduk dan merupakan salah satu masalah kesehatan gigi dan mulut yang cukup besar. Di seluruh dunia, maloklusi memiliki prevalensi tertinggi ke-3 di antara patologi mulut, kedua setelah karies gigi dan penyakit periodontal (Acharya et al., 2018). Perkembangan ilmu kedokteran gigi khususnya bidang kedokteran gigi estetik berkembang pesat sejalan dengan meningkatnya kesadaran masyarakat terhadap penampilan. Perawatan ortodonti bertujuan untuk memperbaiki maloklusi dan ketidaknormalan gigi dari susunan gigi geligi sehingga dapat meningkatkan segi estetik serta fungsional regio dentofasial (Sharaf et al., 2017).

Kontrol penjangkaran menjadi salah satu kunci yang penting untuk memperoleh keberhasilan dalam bidang ortodonti klinis. *Miniscrew* ortodonti merupakan salah satu salah satu komponen penting dalam perawatan ortodonti, dimana *miniscrew* ini berupa sekrup/pin berukuran kecil yang ditanam ke dalam rahang. *Miniscrew* ortodonti digunakan dalam kasus-kasus yang membutuhkan *absolute anchorage* seperti intrusi, ekstrusi, distalisasi, protraksi, *molar uprighting*, koreksi *midline* dan koreksi *occlusal plane* dalam perawatan ortodonti (Bakri et al., 2023). Dalam beberapa kasus, *miniscrew* kadang mengalami kegagalan diantaranya oleh karena infeksi atau gangguan dalam proses osseointegrasi. Kegagalan osseointegrasi diakibatkan oleh kolonisasi bakteri patogen pada permukaan *miniscrew* oleh bakteri patogen (Anggani et al., 2021). Keberadaan bakteri patogen dapat ditemukan juga dalam pembentukan biofilm yang menyebabkan perimplantitis. Bakteri seperti *aggregatibacter actinomycetemcomitans* merupakan bakteri periopatojen paling umum yang menjadi penyebab periimplantitis (Prathapachandra et al., 2012). Salah satu pencegahan untuk periimplantitis adalah pemberian antibiotik baik secara sistemik maupun local. Namun ada banyak faktor yang perlu dipertimbangkan dalam pemberian antibiotik, seperti usia pasien, faktor lokal penyerta, alergi, fungsi ginjal dan hati. Selain itu, komposisi bakteri periimplantitis tidak sama setiap pasien. Reaksi dari pewarnaan gram kebutuhan anaerobik dari microbiota periimplantitis dapat pertama untuk pemilihan terapi antimikroba. Bagaimanapun, antibiotik atau antimikroba bukanlah obat yang tidak beresiko dan harus berdasarkan persyaratan yang ditetapkan dengan jelas.



Salah satu pengembangan terbaru sebagai pencegah perimplantitis dengan cara dilapisi lapisan antibakteri. Modifikasi pelapisan dapat dijadikan sebagai strategi baru dengan cara membuat lapisan antibakteri untuk mencegah infeksi perimplantitis. Beberapa penelitian terdahulu telah melakukan pelapisan *miniscrew* dengan berbagai bahan yang berbeda contohnya melapisi dengan bahan metal antibiotic spektrum luas seperti vancomycin. Namun, risiko yang dilaporkan ialah delaminasi lapisan serta efek toksik pada jaringan di sekitarnya, yang memperburuk potensi komplikasi dan infeksi *miniscrew*. Pendekatan terbaru untuk mengatasi kolonisasi bakteri adalah dengan menggunakan lapisan antibakteri alami yang berasal dari biota laut. Sotong (*Sepia sp.*) merupakan salah satu komoditas perikanan yang banyak dimanfaatkan oleh masyarakat. Cangkang internal sotong dibuang pada saat pengolahan masakan dan hingga saat ini belum dimanfaatkan. Limbah yang berasal dari sotong juga bervariasi berkisar antara 65 – 85% dari berat sotong, tergantung dari jenisnya. Limbah tulang sotong dapat menimbulkan masalah pencemaran lingkungan terutama masalah penumpukan dan bau yang dikeluarkan (Mursal et al., 2022).

Cangkang internal ini mengandung kitin yang dapat diekstraksi menjadi kitosan. Karena mengandung polikation, kitosan mampu menekan pertumbuhan bakteri. Kitosan memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri Gram positif dan negatif, serta jamur. Kitosan berpotensi untuk dijadikan sebagai bahan antibakteri, karena mengandung enzim lisozim dan gugus amino polisakarida yang mampu menghambat pertumbuhan mikroba. Kitosan juga merupakan biopolimer yang bersifat hidrofobik, sehingga kitosan sangat cocok jika digunakan sebagai bahan komposit pembentuk lapisan. Kitosan juga memiliki sifat *biocompatible* terhadap tubuh, sehingga kitosan juga dimanfaatkan sebagai material pengganti tulang dan gigi (Rochmawati et al., 2018). Banyaknya limbah dari pengolahan sotong ini dapat dimanfaatkan menjadi ekstrak kitosan yang dapat digunakan sebagai bahan lapisan antibakteri. Lapisan antibakteri ini diharapkan dapat mencegah perlekatan bakteri pada permukaan implant, sehingga mencegah pembentukan biofilm.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang penelitian ini, maka yang menjadi rumusan masalah adalah apakah pelapisan kitosan dari ekstrak tulang sotong (*Sepia sp.*) mampu menghambat pembentukan biofilm *aggregatibacter actinomycetemcomitans* pada permukaan *miniscrew* ortodonti ?



1. **Uji** efek pelapisan chitosan dari ekstrak tulang sotong (*Sepia*) terhadap pembentukan biofilm *aggregatibacter actinomycetemcomitans* pada permukaan *miniscrew* ortodonti

1.4 Manfaat Penelitian

1. Mempelajari penelitian eksperimental dan menemukan bahwa ekstrak tulang sotong memiliki aktivitas antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Hal ini merupakan persyaratan tugas untuk memperoleh gelar S.KG di Fakultas Kedokteran Gigi Program Studi Pendidikan Dokter Gigi Universitas Hasanuddin.
2. Memberikan informasi bagi masyarakat bahwa tulang sotong mempunyai efek terhadap bakteri berdasarkan penelitian in-vitro di laboratorium.
3. Digunakan sebagai salah satu acuan untuk menghasilkan lapisan dari bahan dasar tulang sotong sehingga nanti menjadi salah satu opsi agen antibakteri untuk mengurangi penyakit periodontitis pada pengguna *miniscrew* ortodonti.



BAB II METODE PENELITIAN

2.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan berupa penelitian eksperimen laboratoris dengan desain penelitian *post-test-only-controlled group* untuk menentukan pengaruh kitosan dari ekstrak tulang sotong terhadap pertumbuhan bakteri *aggregatibacter actinomycetemcomitans*

2.2. Waktu dan Tempat Penelitian

2.2.1. Tempat

1. Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Muslim Indonesia
2. Laboratorium Kimia Fakultas Farmasi Universitas Muslim Indonesia

2.2.2. Waktu

Penelitian dilakukan mulai Desember 2023 – Februari 2024.

2.3. Variabel Penelitian

2.3.1. Variable Bebas

Variable bebas dari penelitian ini adalah kitosan dari ekstrak tulang sotong (*Sepia sp.*) dengan konsentrasi 0,4%, 0,6%, dan 0,8%.

2.3.2. Variabel Terikat

Variable terikat dari penelitian ini adalah zona hambat kitosan terhadap bakteri *aggregatibacter actinomycetemcomitans*

2.3.3. Variabel Kendali

Waktu, media kultur, dan suhu.

2.4. Definisi Operasional

2.4.1. Ekstrak Tulang Sotong

Ekstrak tulang sotong (*Sepia sp.*) adalah kitosan yang diperoleh dari tulang sotong melalui metode deproteinasi, demineralisasi dan deasitilasi. Dengan konsentrasi 0,4%, 0,6%, 0,8%. Ekstrak tulang sotong (*Sepia sp.*) dalam bentuk sediaan bubuk.



ekstrak tulang sotong dalam menghambat pertumbuhan bakteri *aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang merupakan salah satu bakteri periodontitis.

2.4.3. Kontrol Positif

Antibiotik azithromycin diletakkan pada media yang telah diinokulasi oleh bakteri *aggregatibacter actinomycetemcomitans* sebagai salah satu bakteri perimplantitis.

2.4.4. Kontrol Negatif

Asam asetat 0,1% sebagai pelarut.

2.5. Populasi dan Sampel penelitian

2.5.1. Besar Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah mikroorganismen rongga mulut yang menjadi penyebab terjadinya penyakit periodontal. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah biakan murni bakteri *aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang diperoleh dari laboratorium mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin. Menurut fereder, rumus penentuan sampel untuk uji eksperimental dengan perlakuan sebanyak 5 perlakuan yaitu sebagai berikut:

$$(n-1) (t-1) \geq 15$$

$$(n-1) (5-1) \geq 15$$

$$(n-1) (4) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

Keterangan:

n: Banyaknya sampel (pengulangan)

t: Banyaknya perlakuan

Berdasarkan rumus diatas, maka besar sampel yang digunakan adalah 4,75 atau dibulatkan menjadi 5 sampel. Besar sampel yang digunakan sebagai acuan dilakukannya pengulangan pada penelitian ini adalah 5 kali pengulangan.



el
si

long (*Sepia sp.*) yang telah di demineralisasi dan deasitilasi.
agregatibacter actinomycetemcomitans yang telah dibiakkan

2. Kriteria Eksklusi

- Ekstrak tulang sotong (*Sepia sp*) yang telah terkontaminasi
- Bakteri *aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang telah terkontaminasi.

2.6. Alat dan Bahan Penelitian

2.6.1. Alat

1. Fujitsu Fsr-B
2. Kompor Listrik
3. Oven Listrik
4. Saringan
5. Alat Pengaduk
6. Beaker Glass
7. Pipet
8. Inkubator
9. Autoklaf
10. Spektrofotometri(Uv-Vis Amv11)
11. Vortex
12. Microplate 96 well
13. Timbangan analitik
14. Vial
15. Erlenmeyer
16. Mikropipet
17. Jarum ose
18. Tabung reaksi
19. Cawan petri
20. Tips mikropipet steril

2.6.2. Bahan

1. Tulang sotong (*Sepia Sp*)
2. NaOH
3. CH₃COOH
4. Aquades
5. Hcl
6. Bakteri *aggregatibacter actinomycetemcomitans*
7. Strach Nitrat Broth (SNB)
8. Nutrient Broth (NB)
9. Nutrient Agar (NA)



on Agar (MHA)

tat

%

ogis 0.9%

in

isan ekstrak tulang sotong

10 mm

17. Larutan glutaraldehid 2%

2.7. Prosedur penelitian

2.7.1. Pembuatan Ekstrak Tulang Sotong menjadi Kitosan

Pembuatan kitosan dari tulang sotong mengacu pada prosedur pembuatan kitosan yang mencakup tiga proses yaitu deproteinasi, demineralisasi dan deasetilasi (Nadia et al., 2021). Deproteinasi dilakukan untuk menghilangkan protein pada tulang sotong. Tulang sotong ditimbang dengan berat 100 gr ditambahkan larutan NaOH 3 N dengan perbandingan 1:10 dan dipanaskan pada suhu 90 °C selama 1 jam sambil diaduk, kemudian disaring dan dicuci sampai pH netral dengan menggunakan akuades. Deaminirelisasi dilakukan menghilangkan mineral dengan cara hasil deproteinasi ditambahkan larutan HCl 1 N dengan perbandingan 1:7 dan dipanaskan pada suhu 90 °C selama 1 jam sambil diaduk. kemudian disaring dan dicuci sampai pH netral. Pencucian dilakukan dengan menggunakan akuades sampai pH netral, kemudian dikeringkan dan diperoleh kitin. Deasetilasi Kitin yang telah dihasilkan dimasukkan dalam larutan NaOH 50% dengan perbandingan 1:20. Dipanaskan pada suhu 140 °C sambil diaduk selama 2 jam. Pencucian dilakukan dengan akuades sampai pH netral. Selanjutnya dikeringkan dan di peroleh kitosan larutan asam.

2.7.2. Pembuatan Ekstrak Tulang Sotong dengan berbagai Konsentrasi

Pembuatan ekstrak tulang sotong dengan konstentrai 0,4%, 0,6%, dan 0,8% dapat dimulai dengan menimbang ekstrak daun mulai dari 0,4 g, 0,6 g, dan 0,8 g. kemudian ekstrak tulang sotong diencerkan menggunakan larutan saline sebanyak 10 ml ke dalam cawan petri steril. Selanjutnya aduk hingga homogen antara kedua larutan dan variasi konsentrasi larutan telah diperoleh.

2.7.3. Persiapan Bakteri *A. Actinomycetemcomitans*

Pembuatan kultur starter dilakukan dengan memasukkan 1/4 plate isolat *aggreatibacter actinomycetemcomitans* ke dalam erlenmeyer yang berisi media SNB sebanyak 50 mL yang sudah disterilkan. Kultur diinkubasi pada suhu kamar selama 5 hari dengan pengadukan menggunakan *magnetic stirer*.

2.7.4. Pembuatan Lapisan dari Kitosan



asi kimiawi menurut metodologi Bumgardiner dengan beberapa unakan untuk melapisi miniscrew dengan kitosan. Miniscrew dalam larutan air/etanol 5:95 vol% yang diaduk dan diasamkan dengan asam asetat 10 M. Selanjutnya, agen penghubung garam nbahkan selama 10 menit pada suhu ruangan sementara pH antara 4,5-5,5 dengan 1 M NaOH atau asam asetat 10 M. Setelah dicuci menggunakan etanol dan diawetkan pada suhu 110°C

selama 10 menit. Miniscrew kemudian disuspensikan dalam larutan glutaraldehid 2 vol% yang diaduk pada pH 4,3 pada suhu kamar semalam. Larutan kitosan 2 wt% dibuat dengan asam asetat 0,2% pada RT dan disimpan pada suhu 4°C semalaman. Kemudian, 1 ml dari setiap larutan kitosan dituang di atas cakram implan pada suhu kamar. Kelebihan air dibiarkan menguap selama 5-7 hari untuk membentuk lapisan tipis. Miniscrew yang telah dilapisi disterilkan menggunakan sinar ultraviolet (UV) selama satu jam, diikuti dengan perendaman dalam etanol (70%) selama 2 jam, dan kemudian dicuci dua kali dengan larutan buffer fosfat (PBS). Sebelum kultur sel, satu miniscrew dari masing-masing kelompok dievaluasi menggunakan scanning electron microscopy (Alnufaiy et al., 2020).

2.7.5. Uji Antibakteri Metode Difusi Sumuran

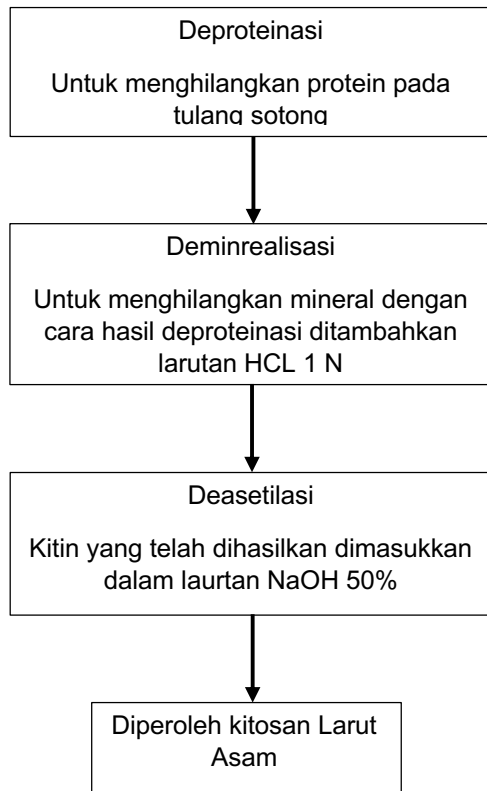
Cawan petri yang dilengkapi pencadang berisikan media NA sebanyak 10 mL sebagai lapisan pertama dibiarkan hingga mengeras setelah itu penuangan media NA sebanyak 10 mL yang didalamnya ada bakteri uji sebagai lapisan kedua, setelah itu didiamkan didalam laminar air flow selama dua jam untuk membiarkan media mengeras dan bakteri berdifusi, kemudian pencadang dikeluarkan sehingga diperoleh sumur- sumur yang berdiameter 5 mm. selanjutnya penuangan antibakteri nanopartikel kitosan dan kontrol pembanding kedalam sumur masing-masing sebanyak 200 μ L setelah itu dimasukkan kedalam inkubator pada suhu 37⁰C selama 3x24 jam, kemudian dilakukan pengamatan zona bening atau zona hambat setiap 24 jam (Alce et al.,2020).

2.8. Analisis Data

Data dianalisis dan diolah menggunakan Uji *Analysis of Variance*(Anova) dengan SPSS versi 24.0.



2.9. Pembuatan Ekstrak Tulang Sotong Menjadi Kitosan



2.10. Uji Antibakteri Metode Difusi Sumuran

