

Perbandingan Efektivitas Kitosan (2-Acetamido-2-Deoxy-D-Glucopyranose) dan Nano Kitosan terhadap Pertumbuhan Bakteri *Enterococcus faecalis* secara *In Vitro*

Debrina Candra Mardy Qudsi*, Sudjari**, Siwipeni Imawanti Rahayu***

ABSTRAK

Enterococcus faecalis merupakan bakteri penyebab vaginitis aerobik pada wanita. Saat ini resistensi bakteri *Enterococcus faecalis* terhadap antimikroba sering dilaporkan sebagai permasalahan yang harus diperhatikan di seluruh dunia. Kitosan merupakan salah satu alternatif bahan terapi. Dalam bidang nanoteknologi, kitosan dapat diolah menjadi nano kitosan yang mempunyai daya absorpsi yang tinggi jika dibandingkan dengan kitosan biasa. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan dan membandingkan efektivitas kitosan dan nano kitosan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* secara *in vitro*. Penelitian ini adalah *true experimental post test only design* dengan metode difusi sumur. Kitosan dan nano kitosan dilarutkan menggunakan asam asetat. Konsentrasi kitosan dan nano kitosan yang digunakan adalah 1 %; 0,5 %; 0,25 %; 0,125 %, dan 0,0625 %. Data hasil penelitian dianalisis dengan uji *one way ANOVA*, uji korelasi dan regresi dengan tingkat kepercayaan 95 % ($\alpha = 0,05$). Dari hasil penelitian didapatkan kadar kitosan pada konsentrasi 1%; 0,5 %; 0,25 %; 0,125 %, dan 0,0625 % menghasilkan zona hambat sebesar 36,68 mm, 31,18 mm, 30,56 mm, 26,50 mm, dan 19,81 mm. Sementara kadar nano kitosan dengan konsentrasi 1 %; 0,5 %; 0,25 %; 0,125 %, dan 0,0625 % menghasilkan zona hambat sebesar 35,52 mm, 31,18 mm, 29,94 mm, 25,75 mm, dan 22,23 mm. Kesimpulan penelitian ini adalah kitosan dan nano kitosan mempunyai efektivitas sebagai antimikroba terhadap bakteri *Enterococcus faecalis* secara *in vitro* dan tidak terdapat perbedaan efektivitas yang bermakna pada nano kitosan dalam menghambat pertumbuhan *Enterococcus faecalis* jika dibandingkan dengan kitosan.

Kata kunci : *Enterococcus faecalis*, Kitosan, Nano kitosan, Vaginitis aerobik.

Effectiveness Comparison of Chitosan (2-Acetamido-2-Deoxy-D-Glucopyranose) and Nano Chitosan on the Growth of *Enterococcus faecalis* In Vitro

ABSTRACT

Enterococcus faecalis is an aerobic bacterium that causes aerobic vaginitis in women. Currently, *Enterococcus faecalis* is frequently reported as a problem in developed countries and developing countries due to its resistance to antimicrobial drugs. One of some drugs alternative therapies is chitosan. In nanotechnology, chitosan can be processed as nano chitosan which has high absorption rate when compared to regular chitosan. This study aimed was to verify and compare the effect of chitosan and nano chitosan to prevent the growth of *Enterococcus faecalis* in vitro. This research was true experimental research post test only design with well diffusion method. Chitosan and nano chitosan were dissolved in acetic acid. The concentration of chitosan and nano chitosan using in this study were 1 %; 0.5 %; 0.25 %; 0.125 % and 0.0625 %. The result was analyzed using one way ANOVA, correlation test and regression test with 95 % confidence level ($\alpha = 0.05$). The result showed that inhibitory zone of chitosan with concentration 1 %; 0.5 %; 0.25 %; 0.125 %, and 0.0625 % were 36,6875 mm, 31,1875 mm, 30,5625 mm, 26,5 mm, and 19,8125. The inhibitory zone of nano chitosan with the same concentration were 35,525 mm, 31,1875 mm, 29,9375 mm, 25,75 mm, and 22 225 mm. This study concluded that chitosan and nano chitosan are effective as antimicrobial agents for *Enterococcus faecalis* bacteria in vitro but there are no significant between nano chitosan and chitosan for inhibiting the growth of *Enterococcus faecalis*.

Keywords : Aerobic vaginitis, Chitosan, *Enterococcus faecalis*, Nano chitosan.

* Program Studi Kebidanan, FKUB

** Laboratorium Parasitologi, FKUB

*** Laboratorium Mikrobiologi, FKUB

PENDAHULUAN

Vaginitis seperti candidiasis, vaginosis bakterial, dan trichomoniasis merupakan suatu kondisi klinis yang sering ditemukan pada vagina.¹ Dalam kasus-kasus sedang dan berat reaksi terhadap bakteri penyebab VA ini dapat dilihat dari adanya peningkatan jumlah leukosit dan terkadang dapat disertai adanya toksin di dalam tubuh.²

Prevalensi VA masih cukup tinggi yakni mencapai 51 %, dengan rincian kandidiasis 17 % dan vaginosis bakterial (BV) sebesar 15 %.¹ Penelitian di Karnataka menemukan bahwa prevalensi VA sebesar 40,8 % pada usia 26–30 tahun.³ Penyebab VA terbanyak disebabkan oleh bakteri Gram positif yakni sebesar 59,7 % sedangkan yang disebabkan oleh Gram negatif sebesar 10,5 %. Beberapa bakteri aerob patogen yang ditemukan dalam swab vagina antara lain *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Klebsiella* spp., dan *Escherichia coli*.⁴ Pengobatan yang dilakukan pada infeksi vagina yang disebabkan oleh bakteri *Enterococcus faecalis* dapat dilakukan dengan menggunakan antibiotik secara topikal maupun oral.^{5,6} Namun resistensi bakteri tersebut terhadap antimikroba kini makin sering dilaporkan sebagai permasalahan yang harus diperhatikan di seluruh dunia, baik di negara maju maupun negara berkembang, Infeksi bakteri ini tak hanya dilaporkan di rumah sakit, namun juga pada komunitas.^{7,8}

Kitosan adalah suatu bahan alami dan terdapat banyak di alam yang diduga dapat menghambat pertumbuhan *Enterococcus faecalis*. Kitosan merupakan biopoliaminosakarida linear alami yang diperoleh dari deasetilasi kitin.⁹ Dalam bidang kedokteran kitosan dapat digunakan untuk mencegah pertumbuhan *Candida albicans* dan *Staphylococcus aureus*. Selain sebagai antimikroba dan antijamur, kitosan memiliki sifat sebagai antikoagulan,

antitumor dan antivirus.¹⁰ Kitosan merupakan jenis polimer alam yang mempunyai rantai tidak linier dan disebut sebagai poli β -(1,4)-2 amino- 2-deoksi-D-glukopiranosida. Kitosan merupakan turunan utama dari kitin yang berasal dari kulit *crustaceae*, serangga, dan fungi.^{11,12}

Kitosan berpotensi untuk dijadikan sebagai bahan antimikroba karena kitosan mengandung enzim lisozim dan gugus aminopolisakarida yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba. Kemampuan dalam menekan pertumbuhan bakteri kitosan berasal dari adanya polikation bermuatan positif pada kitosan yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri dan kapang (jamur multiseluler).¹³ Sekarang ini, banyak ahli yang mengolah kitosan dengan nanoteknologi dan menghasilkan substansi yang disebut dengan nanokitosan.¹⁴ Nanokitosan merupakan kitosan dengan ukuran partikel 100-400 nm. Menurut Cheung *et al* (2008) nanokitosan mempunyai daya absorpsi yang tinggi jika dibandingkan dengan kitosan biasa. Dalam dunia farmasi, partikel nano sering digunakan karena jauh lebih mudah diserap oleh tubuh dan memiliki daya kelarutan yang tinggi. Selain itu, partikel nano terbukti unggul dalam hal stabilitas, sehingga diharapkan dapat mengobati penyakit dengan cepat, efektif, dan efisien.¹⁵

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan dan membandingkan efektivitas kitosan dan nano kitosan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis*. Diharapkan penelitian ini dapat berguna untuk masyarakat luas dalam hal terapi penyakit, terutama vaginosis aerobik, yang disebabkan oleh bakteri *Enterococcus faecalis*.

BAHAN DAN METODE

Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah penelitian true eksperimental laboratorik dengan *post test only control group design*. Uji efektivitas kitosan dan nanokitosan sebagai antimikroba dilakukan secara *in vitro* menggunakan metode difusi sumur untuk mengetahui KHM (kadar hambat minimal).

Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis kitosan dan nano kitosan dan variabel tergantung adalah pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis*.

Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Enterococcus faecalis* koleksi Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Isolat bakteri *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 yang digunakan berasal dari BBLK Yogyakarta. Dalam penelitian ini, banyaknya pengulangan yang dilakukan ditentukan berdasarkan perhitungan rumus¹⁶:

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

p : jumlah perlakuan

n : jumlah sampel tiap kelompok.

Jadi dalam penelitian ini jumlah sampel pengulangan adalah sebanyak 4 kali.

Identifikasi Bakteri

Pengecatan Gram dilakukan dengan cara satu ose bakteri dari biakan cair diletakkan pada *object glass* ditunggu hingga kering kemudian difiksasi dengan memberikan pemanasan secukupnya lalu diberi larutan kristal violet, didiamkan 1 menit lalu bilas dengan air yang mengalir.

Kemudian diberi larutan lugol didiamkan 1 menit dan dibilas dengan air yang mengalir. Beri larutan alkohol 96 % selama 5-10 detik, bilas dengan air yang mengalir. Kemudian diberi larutan safranin, diamkan 30 detik, dibilas dengan air yang mengalir lalu sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap. Tetesi minyak emersi dan dilihat di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x dan dicari adanya sel bakteri Gram positif. Selanjutnya bakteri diuji menggunakan uji katalase dengan cara mengambil sebagian perbenihan cair dan diletakkan pada gelas objek dan meneteskan dengan larutan H₂O₂ 3 %. Lalu dilakukan *salt tolerance test* dilakukan dengan cara Tube : BHI + 6,5 % NaCl + pH indikator (bromocresol purple) dan memasukan maksimal 3 koloni dari kultur berusia 18-24 jam, diinkubasi selama 24-72 jam pada suhu 37 °C. Uji biokimia (L-arabinose, arginin dihidrolase dan manitol) menggunakan strip microbact dengan mengambil ±5 koloni dari kultur berusia 18-24 jam, dilarutkan kedalam 1 cc NS lalu memasukan reagen L-arabinose, arginin dihidrolase dan manitol dalam sumuran uji biokimia kemudian memasukan 100 µl larutan berisi bakteri dalam sumuran, tutup dengan selotip dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Kemudian kultur *Enterococcus faecalis* ditanam dalam BAP selama 18-24 jam untuk melakukan uji hemolisis.

Pembuatan Suspensi Bakteri

Koloni *Enterococcus faecalis* dari media *blood agar plate (BAP)* ditanam pada media *brain heart infusion* sebanyak 5 ml. Kemudian diukur ODnya pada panjang gelombang 625 nm untuk mendapatkan konsentrasi bakteri sebesar 10⁸ CFU/ml yang setara dengan OD = 0,1. Untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi 10⁶ CFU/ml maka dilakukan penghitungan rumus sebagai berikut:

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

Keterangan:

N_1 = Konsentrasi bakteri yang dicari

V_1 = Volume bakteri yang akan ditambah dengan pengencer

N_2 = OD (0,1 setara dengan 10^8 CFU/ml)

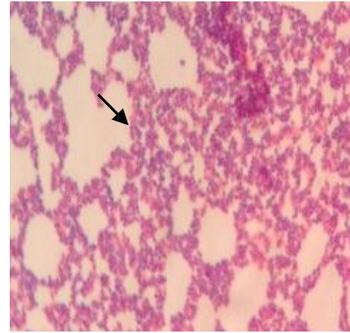
V_2 = Volume suspensi bakteri uji (10 ml)

Uji Daya Antibakteri Kitosan dan Nano Kitosan terhadap *Enterococcus faecalis* secara *In Vitro*

Pada medium BHI (hard agar dan soft agar) dibuat sumuran berdiameter 6 mm pada medium hard agar kemudian ditambahkan suspensi bakteri *Enterococcus faecalis* sebanyak 0,1 ml bakteri 10^6 CFU/ml diteteskan pada Hard Agar dalam cawan petri lalu diratakan. Lalu dituangkan medium soft agar (hangat–hangat kuku), goyang searah jarum jam dan membiarkan hingga dingin dan memadat kemudian mengambil alat sumuran. Masukkan larutan kitosan maupun nano kitosan dengan konsentrasi 1 %, 0,5 %, 0,25 %, 0,125 %, 0,0625 % ke dalam masing-masing lubang sebanyak 50 μ l. Plate kemudian dimasukan ke dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37 °C. Daya antibakteri yang terjadi ditentukan dengan mengukur diameter zona hambatan pertumbuhan dengan menggunakan jangka sorong dan pengulangan perlakuan sebanyak 4 kali.¹⁷

HASIL

Hasil pewarnaan Gram bakteri *Enterococcus faecalis* adalah ungu, berbentuk kokus dan merupakan bakteri Gram positif. Hasil pewarnaan Gram bakteri *Enterococcus faecalis* dapat dilihat pada Gambar 1.

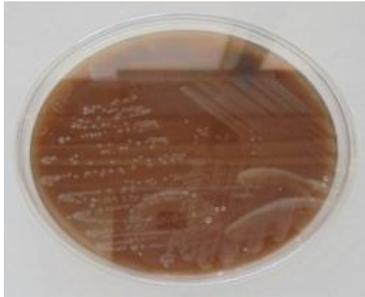


Gambar 1. Hasil identifikasi *Enterococcus faecalis* dengan pewarnaan Gram adalah berbentuk kokus dan bersifat Gram positif.

Hasil uji katalase adalah negatif karena tidak terbentuk gelembung ketika ditetesi H_2O_2 . Hal ini menunjukkan bahwa bakteri *Enterococcus faecalis* tidak memproduksi enzim katalase (Gambar 2). Hasil uji hemolisis menandakan bahwa bakteri *Enterococcus faecalis* merupakan bakteri gamma hemolisis (γ) atau disebut juga non hemolisis (Gambar 3). Pada uji *salt tolerance* tidak didapatkan perubahan warna pada medium setelah diinkubasi selama 24 jam akan tetapi terjadi perubahan kekeruhan. Hal ini menandakan adanya pertumbuhan bakteri (Gambar 4). Pada uji biokimia L-arabinose adalah negatif (warna biru), uji arginin positif (warna biru), uji manitol negatif (warna biru tua–hijau) (Gambar 5).



Gambar 2. Hasil identifikasi *Enterococcus faecalis* dengan uji Katalase (katalase negatif, bakteri anaerob)



Gambar 3. Hasil identifikasi *Enterococcus faecalis* dengan uji hemolisis (BAP) (Gamma hemolisis (γ), tidak ada perubahan warna).



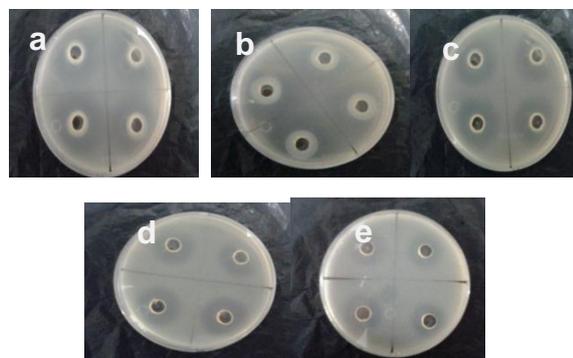
Gambar 4. Hasil identifikasi *Enterococcus faecalis* dengan uji salt tolerance setelah 24 jam (turbiditas (+), tidak ada perubahan warna medium).



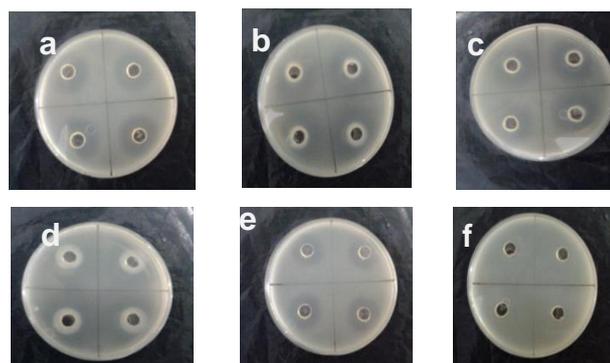
Gambar 5. Hasil identifikasi *Enterococcus faecalis* dengan uji biokimia (Arginin dihidrolase (+), Manitol (-), L-arabinose (-)).

Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat antara Kitosan dan Nano Kitosan terhadap *Enterococcus faecalis*

Penelitian ini menggunakan beberapa macam konsentrasi dari kitosan dan nano kitosan yaitu 1 %, 0,5 %, 0,25 %, 0,125 % dan 0,0625 %. Penentuan perbedaan daya antibakteri antara kitosan dan nano kitosan dilakukan dengan metode difusi sumuran. Perbedaan daya antibakteri ditentukan berdasarkan besar diameter zona hambatan pada medium BHI yang telah dicampurkan dengan bakteri *Enterococcus faecalis* kemudian diteteskan kitosan atau nano kitosan. Perubahan yang diamati pada penelitian ini yakni terbentuknya diameter zona hambatan bakteri yang ada di sekeliling sumuran. Hasil uji daya antibakteri kitosan dan nano kitosan pada masing-masing konsentrasi yakni 1 %, 0,5 %, 0,25 %, 0,125 % dan 0,0625 % dengan menggunakan metode difusi sumuran disajikan pada Gambar 6 dan 7 berikut.



Gambar 6. Zona hambatan *Enterococcus faecalis* pada medium NAP dengan berbagai konsentrasi kitosan: (a). 1 %, (b). 0,5 %, (c). 0,25 %, (d). 0,125 % dan (e). 0,0625 %.



Gambar 7. Zona hambat *Enterococcus faecalis* pada medium NAP dengan berbagai konsentrasi nano kitosan: (a). 1 %, (b). 0,5 %, (c). 0,25 %, (d). 0,125 %, (e). 0,0625 % dan (f). Kontrol.

Berdasarkan hasil uji difusi sumuran dapat diukur zona hambatan bakteri dan dapat ditentukan perbedaan daya antibakteri antara kitosan dan nano kitosan terhadap

Enterococcus faecalis. Hasil perhitungan diameter zona hambat kitosan dan nano kitosan disajikan pada Tabel 1 dan 2.

Tabel 1. Hasil perhitungan zona hambat bakteri *Enterococcus faecalis* 10^6 cfu/ml pada berbagai konsentrasi perlakuan kitosan.

Konsentrasi (%)	Zona Hambatan Kitosan				Rerata (mm)	Standar Deviasi
	Pengulangan					
	I	II	III	IV		
1	36	33,25	37,25	36,25	36,6875	± 1,172
0,5	31	29,75	32	32	31,1875	± 1,068
0,25	30,25	31,25	30,25	30,5	30,5625	± 0,473
0,125	27,5	25	27,5	26	26,5	± 1,225
0,0625	19,5	20	20	19,75	19,8125	± 0,239

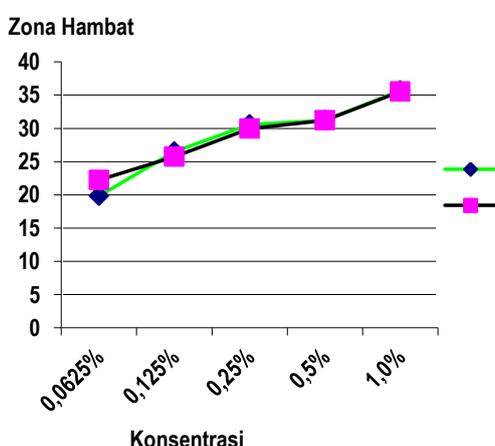
Pada Tabel 1 di atas dapat dilihat perbedaan zona hambat pada setiap perlakuan yang menunjukkan adanya perbedaan kemampuan kitosan dalam menghambat pertumbuhan bakteri pada masing-masing kelompok perlakuan. Kitosan dengan konsentrasi 1 %, 0,5 %, 0,25 %, 0,125 %, dan 0,0625 % menghasilkan

zona hambatan yang mengartikan bahwa kitosan memiliki sifat antibakteri terhadap *Enterococcus faecalis*. Zona hambatan sudah terbentuk pada konsentrasi kitosan 0,06 %, sedangkan pada konsentrasi 1 % menunjukkan zona hambatan terbesar.

Tabel 2. Hasil perhitungan zona hambat bakteri *Enterococcus faecalis* 10⁶ cfu/ml pada berbagai konsentrasi perlakuan nano kitosan.

Konsentrasi (%)	Zona Hambatan Nano Kitosan				Rerata (mm)	Standar Deviasi
	Pengulangan					
	I	II	III	IV		
1	35,0	34	36,6	36,5	35,525	± 1,253
0,5	29,5	31,75	31,5	32	31,1875	± 1,143
0,25	29,75	28,75	31,25	30,0	29,9375	± 1,028
0,125	25	25,75	25,75	26,5	25,75	±0,612
0,0625	23	22,25	21,65	22,0	22,225	± 0,572

Pada Tabel 2 di atas dapat dilihat perbedaan zona hambat pada setiap perlakuan yang menunjukkan adanya sifat nano kitosan yang dapat menghambat pertumbuhan yang berbeda pada masing-masing kelompok perlakuan. Nano kitosan dengan konsentrasi 1 %, 0,5 %, 0,25 %, 0,125 %, dan 0,0625 % menunjukkan bahwa kitosan memiliki sifat antibakteri terhadap *Enterococcus faecalis*. Zona hambatan sudah terbentuk pada konsentrasi kitosan 0,06 %, sedangkan pada konsentrasi 1 % menunjukkan zona hambatan terbesar.



Gambar 8. Nilai zona hambat bakteri *Enterococcus faecalis* terhadap perubahan konsentrasi kitosan dan nano kitosan.

Berdasarkan Gambar 8 nilai zona hambat bakteri *Enterococcus faecalis* terhadap konsentrasi kitosan dan nano kitosan terlihat perbedaan nilai zona

hambat bakteri hanya pada konsentrasi kitosan dan nano kitosan 0,0625 % dengan nilai zona hambat 19,81 mm dan 22,22 mm. Namun pada konsentrasi lainnya tidak terlihat adanya perbedaan yang nyata terhadap pemberian kitosan dan nano kitosan terhadap nilai zona hambat bakteri *Enterococcus faecalis*. Pada Gambar 8 di atas juga dapat dilihat bahwa semakin tinggi konsentrasi maka zona hambatnya semakin besar.

Analisis Data

One way ANOVA

One way ANOVA merupakan pengujian untuk mengetahui perbedaan nyata pada konsentrasi kitosan dan nano kitosan terhadap rerata pertumbuhan koloni *Enterococcus faecalis*. Dari hasil uji one way ANOVA didapatkan angka signifikansi kitosan sebesar 0,000 ($p < 0,05$) dan nano kitosan sebesar 0,000 ($p < 0,05$). Hal ini berarti efek perubahan konsentrasi kitosan dan nano kitosan terhadap jumlah rerata koloni *Enterococcus faecalis* adalah berbeda secara signifikan pada taraf kepercayaan 95 %.

Post Hoc Test Tukey

Uji *post hoc* Tukey merupakan uji perbandingan berganda (*multiple comparisons*). Uji ini menunjukkan pasangan kelompok sampel (kelompok perlakuan atau konsentrasi dan jumlah koloni) yang

memberikan perbedaan yang signifikan dan yang tidak memberikan perbedaan secara signifikan. Dari hasil uji *post hoc* Tukey diketahui bahwa ada perbedaan yang signifikan pada setiap pasangan kelompok sampel kitosan (K) dan nano kitosan (N) yang ditunjukkan oleh angka signifikansi kurang dari 0,010 ($p < 0,05$). Pada kelompok K 1 % yang tidak signifikan adalah N 1 %, K 0,5 % yang tidak signifikan adalah K 0,25 %, N 0,5 % dan N 0,25 %, K 0,25 % yang tidak signifikan adalah K 0,25 %, N 0,5 % dan N 0,25 %, K 0,125 % yang tidak signifikan adalah N 0,125 %, K 0,06 % yang tidak signifikan adalah N 0,06 %, N 1 % yang tidak signifikan adalah K 1 %, N 0,5 % yang tidak signifikan adalah K 0,5 %, K 0,25 % dan N 0,25 %, N 0,25 % yang tidak signifikan adalah K 0,5 % dan K 0,25 %, N 0,125 % yang tidak signifikan adalah K 0,125 %, dan N 0,06 % yang tidak signifikan adalah K 0,06 %. Pada kelompok yang tidak signifikan adalah kelompok yang tidak menunjukkan perbedaan efek yang signifikan pada pertumbuhan jumlah koloni. Nilai signifikansi dari N 1 % adalah 1,000 ($p > 0,05$). Nilai signifikansi antara konsentrasi K 0,25 %, K 0,5 %, N 0,5 % dan N 0,25 % adalah 0,997 ($p > 0,05$). Nilai signifikansi antara konsentrasi N 1 %, N 0,5 %, K 0,5 % dan K 1 adalah 1,000 ($p > 0,05$). Nilai signifikansi antara konsentrasi N 0,125 % dan K 0,125 % adalah 0,967 ($p > 0,05$). Nilai signifikansi antara konsentrasi N 0,25 %, K 0,5 % dan N 0,5 adalah 0,773 ($p > 0,05$). Nilai signifikansi antara konsentrasi N 0,06 % dan K 0,06 % adalah 0,060 ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa perbedaan konsentrasi yang sama antara kitosan dan nano kitosan tidak menunjukkan perbedaan pertumbuhan koloni bakteri yang bermakna.

Tabel 3. Hasil uji statistik homogeneous subsets

Zona Hambat					
Tukey HSD ^a					
Kelompok	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
K 0,06	4	1.98125			
N 0,06	4	2.22250			
N 0,125	4		2.57500		
K 0,125	4		2.65000		
N 0,25	4			2.99375	
K 0,25	4			3.05625	
K 0,5	4			3.11875	
N 0,5	4			3.11875	
N 1	4				3.55250
K 1	4				3.56875
Sig.		.060	.987	.773	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

Pada Tabel 3 diketahui *subset* mana saja yang mempunyai perbedaan reratanya yang tidak signifikan. Pada *homogeneous subsets* ini keenam kelompok koloni bakteri masuk ke dalam empat *subset*. Pada *subset* 1 diisi oleh 2 kelompok dengan konsentrasi kitosan 0,06 % dan nano kitosan 0,06 % (v/v). Pada *subset* 2 diisi oleh 2 kelompok dengan konsentrasi kitosan 0,125 % dan nano kitosan 0,125 % (v/v). Pada *subset* 3 diisi oleh 4 kelompok dengan konsentrasi kitosan 0,25 %, nano kitosan 0,25 %, kitosan 0,5 % dan nano kitosan 0,5% (v/v). Pada *subset* 4 diisi oleh 2 kelompok dengan konsentrasi kitosan 1 % dan nano kitosan 1 % (v/v). Hasil pada *homogeneous subsets* sesuai dengan hasil yang telah didapat pada uji *post hoc* Tukey.

Uji Korelasi Kitosan terhadap Bakteri *Enterococcus faecalis*

Uji korelasi menunjukkan angka signifikansi 0,000 ($p < 0,05$) yang berarti terdapat hubungan yang bermakna antara pemberian kitosan dengan jumlah koloni bakteri *Enterococcus faecalis*. Besar koefisien korelasi Pearson yaitu $r = 0,843$. Tanda positif menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi kitosan maka semakin luas zona hambat yang diperoleh.¹⁸

Uji Korelasi Nano Kitosan terhadap Bakteri *Enterococcus faecalis*

Uji korelasi menunjukkan angka signifikansi 0,000 ($p < 0,05$) yang berarti terdapat hubungan yang bermakna antara pemberian nano kitosan dengan jumlah koloni bakteri *Enterococcus faecalis*. Besar koefisien korelasi Pearson yaitu $r = 0,905$. Tanda positif menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi kitosan maka semakin luas zona hambat yang diperoleh.¹⁸

Uji Regresi Linier

Analisis regresi digunakan untuk menentukan model yang paling sesuai untuk pasangan data serta dapat digunakan untuk membuat model dan menyelidiki hubungan antara dua variabel atau lebih. Dalam penelitian ini uji regresi digunakan untuk mengetahui sejauh mana hubungan antara peningkatan konsentrasi dengan kemampuan penghambatan terhadap koloni. Koefisien determinasi R Square (r^2) kitosan sebesar 0,710 menyatakan besarnya derajat keeratan hubungan antara konsentrasi kitosan dengan jumlah koloni bakteri *Enterococcus faecalis* yaitu 79,9 %. Hal ini berarti kontribusi pemberian kitosan dalam menurunkan jumlah koloni bakteri *Enterococcus faecalis* sebesar 71,0 % sedangkan sisanya 29,0 % disebabkan oleh faktor-faktor lain yang tidak diteliti.¹⁸ Sedangkan R Square (r^2) nano kitosan sebesar 0,819 menyatakan besarnya derajat keeratan hubungan antara konsentrasi nano kitosan dengan jumlah koloni bakteri *Enterococcus faecalis* yaitu 81,9 %. Hal ini berarti kontribusi pemberian nano kitosan dalam menurunkan jumlah koloni bakteri *Enterococcus faecalis* sebesar 81,9 %.

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan efektivitas antara kitosan (2-acetamido-2-deoxy

glucopyranose) dan nano kitosan sebagai antimikroba terhadap bakteri *Enterococcus faecalis* secara *in vitro*. Selain untuk mengetahui hubungan antara kitosan maupun nano kitosan dengan pertumbuhan *Enterococcus faecalis*, penelitian ini juga bertujuan untuk mengetahui kadar hambat minimum (KHM) kitosan maupun nano kitosan terhadap bakteri *Enterococcus faecalis*. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah *well diffusion* atau difusi sumur untuk mengetahui KHM melalui diameter zona inhibisi yang diukur dalam mm.¹⁹ Pada penelitian ini tidak mencari kadar bunuh minimal dikarenakan peneliti hanya mencari perbandingan efektivitas kadar hambat minimum antara kitosan dan nano kitosan pada konsentrasi yang sama.

Kadar Hambat Minimum Kitosan

Kadar hambat minimum (KHM) pada penelitian ini diperoleh dengan mengukur zona hambat kitosan setelah diinkubasikan selama 24 jam. Pada penelitian ini rerata zona hambat yang didapat secara berturut-turut pada konsentrasi 1 %, 0,5 %, 0,25 %, 0,125 % dan 0,0625 % adalah 36,6875 mm; 31,1875 mm; 30,5625 mm; 26,5mm; dan 19,8125 mm. Jadi, semakin luas diameter zona hambat berarti semakin sedikit jumlah bakteri yang tumbuh. Hal ini menunjukkan adanya aktivitas antimikroba dari kitosan dalam menghambat pertumbuhan *Enterococcus faecalis*. Kitosan dapat membunuh bakteri dengan mengganggu dinding sel bakteri sehingga mengakibatkan adanya kerusakan struktur, fungsi dan permeabilitas bakteri kemudian terjadi kebocoran komponen intraseluler dan sel lisis.²⁰

Kadar Hambat Minimum Nano Kitosan

Kadar hambat minimum (KHM) pada penelitian ini diperoleh dengan mengukur zona hambat kitosan setelah diinkubasikan selama 24 jam. Pada penelitian ini rerata

zona hambat yang didapat secara berturut-turut pada konsentrasi 1 %; 0,5 %; 0,25 %; 0,125 % dan 0,0625 % ialah 35,525 mm; 31,1875 mm; 29,9375 mm; 25,75 mm dan 22.225 mm. Jadi, semakin luas diameter zona hambat berarti semakin sedikit jumlah bakteri yang tumbuh di sana. Nano partikel kitosan menunjukkan kemampuan antibakteri lebih tinggi. Nano kitosan dapat menghambat pertumbuhan bakteri lebih tinggi dibandingkan dengan kitosan, hal ini dikarenakan adanya permukaan bermuatan negatif dari sel bakteri sel yang merupakan target dari polikationik. Oleh karena itu, kitosan nano partikel dengan kerapatan muatan polikationik permukaan yang lebih tinggi berinteraksi dengan bakteri ke tingkat yang lebih besar daripada kitosan sendiri. Partikel nano kitosan memberikan afinitas yang lebih tinggi dengan sel bakteri karena luas permukaan yang lebih besar nano partikel kitosan. Nanopartikel bisa teradsorpsi pada permukaan sel bakteri dan mengganggu membran yang mengakibatkan kebocoran komponen intraseluler, sehingga membunuh bakteri.²¹

Perbandingan Kitosan dan Nano Kitosan

Berdasarkan beberapa hasil penelitian yang telah disebutkan di atas maka dapat disimpulkan bahwa kitosan dan nano kitosan mempunyai efek anitimikroba terhadap bakteri, khususnya *Enterococcus faecalis* dikarenakan mengandung enzim lysosim dan gugus aminopolysacharida yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba dan efisiensi daya hambat kitosan terhadap bakteri tergantung dari konsentrasi pelarutan kitosan. Kemampuan dalam menekan pertumbuhan bakteri karena kitosan memiliki polikation bermuatan positif yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri dan kapang (jamur multiseluler).¹³

Pada penelitian ini tidak ada perbedaan yang bermakna antara kitosan dan nano kitosan dalam menghambat pertumbuhan

bakteri *Enterococcus faecalis*. Hal ini dapat dilihat pada Tabel 3 *homogeneous subsets* yang menunjukkan bahwa ada tidak ada perbedaan efektivitas yang bermakna antara kitosan dan nano kitosan sebagai antimikroba terhadap bakteri *Enterococcus faecalis*. Bukti tersebut dapat disebabkan oleh adanya perbedaan derajat deasetilisasi dan berat molekul yang mempengaruhi daya hambat sebagai antimikroba. Perbedaan-perbedaan tersebut dapat disebabkan oleh faktor derajat deasetilasi (DD) yang menunjukkan karakter kitosan dan berat molekulnya. Derajat deasetilasi merupakan persentase atau yang menunjukkan gugus asetil yang hilang digantikan dengan amina. Derajat deasetilasi kitosan menunjukkan keberadaan atau jumlah sisi kationik potensial yang ada di sepanjang rantai polimer. Derajat deasetilasi kitosan dipengaruhi oleh konsentrasi NaOH sebagai penghidrolisis kitin dan suhu proses. Larutan NaOH konsentrasi tinggi ($\leq 40\%$) berfungsi untuk memutuskan ikatan antar gugus karboksil dengan atom nitrogen dari N-asetil. Tingginya konsentrasi NaOH menyebabkan gugus fungsional amino ($-NH^{3+}$) yang mensubstitusi gugus asetil di dalam sistem larutan semakin aktif sehingga proses deasetilasi semakin baik.²² Menurut Candra P (2008) semakin besar konsentrasi NaOH, temperatur dan waktu maka derajat deasetilasi (DD) kitosan yang dihasilkan semakin besar. Proses redeasetilasi secara signifikan memperbesar derajat deasetilasi (DD) kitosan. Selain itu, kekentalan larutan kitosan maupun nano kitosan yang rendah dapat mengakibatkan dengan mudah berdifusi ke media Agar tempat tumbuhnya *Enterococcus faecalis*. Jadi hasil penelitian ini masih belum dapat diaplikasikan secara langsung dalam kasus-kasus infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Enterococcus faecalis*.²³ Oleh karena itu diperlukan penelitian yang lebih luas agar nantinya dapat diaplikasikan secara klinis pada

manusia. Penelitian ini memiliki beberapa kekurangan, diantaranya adalah tidak dibandingkannya daya antibakteri kitosan dan nano kitosan dengan obat standar yang telah diketahui efektivitasnya terhadap *Enterococcus faecalis* seperti gentamisin. Perhitungan berat molekul dari kedua zat yakni kitosan dan nano kitosan tidak dilakukan serta pengukuran nano kitosan melalui SEM. Pada penelitian selanjutnya dapat lebih dilakukan untuk mencari kadar bunuh minimal dengan kisaran konsentrasi dibawah 0,0625 % serta mengukur berat molekul dan derajat deasetilisasi sebelum membandingkan antara kitosan dan nano kitosan.

KESIMPULAN

1. Kitosan dan nano kitosan mempunyai efektivitas sebagai antimikroba terhadap bakteri *Enterococcus faecalis* secara *in vitro*.
2. Tidak terdapat perbedaan efektivitas yang bermakna antara kitosan dan nano kitosan dalam menghambat pertumbuhan *Enterococcus faecalis* pada konsentrasi yang sama (1 %; 0,5 %; 0,25 %; 0,125 %, dan 0,0625 %).

SARAN

Perlunya penelitian lebih lanjut untuk:

- Menguji aktivitas antimikroba kitosan dan nano kitosan terhadap mikroba lain.
- Mengetahui perbedaan kbm antara kitosan dan nano kitosan terhadap *Enterococcus faecalis*.
- Penggunaan kitosan dan nano kitosan yang memiliki derajat deasetilisasi dan berat molekul sama.
- Menguji daya antimikroba kitosan dan nano kitosan dengan menggunakan metode lainnya, seperti dilusi agar atau difusi cakram.

- Mengetahui perbandingan daya antimikroba dengan obat standar.
- Penelitian lebih lanjut secara *in vivo*
- Mengetahui dosis efektif, toksisitas, dan efek samping yang ditimbulkan oleh kitosan dan nano kitosan pada hewan coba yang nantinya dapat diaplikasikan pada manusia sebagai daya antimikroba terhadap *Enterococcus faecalis*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Jahic M, Mirsada M, Jasmina N, Elmira J, Midhat N. Clinical Characteristics of Aerobic Vaginitis and Its Association to Vaginal Candidiasis, Trichomonas Vaginitis and Bacterial Vaginosis. *Med Arh.* 2013; 67(6):428-430.
2. Donders GGG, Vereecken A, Bosmans E, Dekeersmaecker A, Salembier G, Spitz B. Definition of a Type of Abnormal Vaginal Flora that is Distinct from Bacterial Vaginosis: Aerobic vaginitis. *Br J Obstet Gynaecol.* 2002; 109:34.
3. Sangeetha. Study of Aerobic Bacterial Pathogens Associated with Vaginitis in Reproductive Age Group Women (15-45 Years) and Their Sensitivity Pattern. Department Of Microbiology Dr. B.R. Ambedkar Medical College. 2014.
4. Tansarli GS, Kostaras EK, Athanasiou SME, Falagas. Prevalence and Treatment of Aerobic Vaginitis among Non-Pregnant Women: Evaluation of The Evidence For An Underestimated Clinical Entity. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013; 32:977-984.
5. Tempera G, Furneri PM. Management of Aerobic Vaginitis. *Gynecol Obstet Invest* 2010; 70: 244-249.
6. Larsson PG. Treatment of Bacterial Vaginosis. *Int J Std AIDS.* 1992; 3: 239-247.

7. Lestari ES, Severin JA, Verbrugh HA. Antimicrobial Resistance among Pathogenic Bacteria in Southeast Asia: a Review. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2009; 43(2):385-422.
8. Okeke IN, Laxminarayan R, Bhutta ZA, Duse AG, Jenkins P, O'Brien TF, dan Pablas-Mendez A. Antimicrobial Resistance in Developing Countries. Part I: Recent Trends and Current Status. *Lancet*. 2005; 5:481-493.
9. Ismarani PDI, Darusman LK. Mikroenkapsulasi Formula Pegagan-Kumis Kucing-Sambiloto sebagai Inhibitor Angiotensin I Converting Enzyme secara *In Vitro*. *Jurnal Agribisnis dan Pengembangan Wilayah*. 2011; 3(1).
10. Sugita P, Sjahriza A, Wukirsari T, Wahyono D. *Kitosan Sumber Biomaterial Masa Depan*. Bogor: IPB Press. 2009.
11. Adriana CW, Arguelles, Mound FM. Goycoolea CP. Diffusion through Membrane of Polyelectrolyte Complex of Chitosan and Alginate. *Macromol Biosci*. 2003.
12. Sanford PA, GP Hutchings. Industrial Polysaccharides. Di dalam: *Genetic Engineering, Structure/Property Relation and Application*. Amsterdam: Elsevier. 1987. p 363-375.
13. Cheung WH, S Szeto, G McKay. Enhancing the Adsorption Capacities of Acid Dyes by A Chitosan Nano Particle. Hongkong: Department of Chemical Engineering. University of Science and Technology. 2008.
14. Szeto Yau-shan and Zhigang Hu. Article Exploring Nanochitosan. *ATA-Journal for Asia on Textile&Apparel*. 2007.
15. Hamirsia D. Application Nanotechnology to Medicine. Kharagpur: ITT. 2010.
16. Solimun. Diklat Metodologi Peneliti IKIP dan PKM Kelompok Agrokompleks. Malang: Universitas Brawijaya. 2001.
17. Dart RK. *Microbiology of the Analytical Chemist*. London: The Royal Society Of Chemistry. 1996.
18. Riduwan dan Sunarto. Pengantar Statistika untuk Penelitian Pendidikan, Sosial, Komunikasi, Ekonomi, dan Bisnis. Bandung: Alfabeta. 2007. Hlm 304.
19. Daniyan SY and HB Mahammad. *Afri J of Biotec*. 2008; 7(14):2451-2453.
20. Fang Li X, Feng X, Yang S, Fu G, Wang T, Su Z. Chitosan Kills *Escherichia coli* through Damage to be of Cell Membrane Mechanism. *Carbohydrate Polymers*. 2010; 79:493–499
21. Avadi MR, Sadeghi AMM, Tahzibi A, Bayati Kh, Pouladzadeh M, Zohuriaan-Mehr MJ, Rafiee TM. *Eur Polym J*. 2004; 40:1355–1361.
22. Rochima E, Sugiyono DS, MT Suhartono. Derajat Deasetilasi Kitosan Hasil Reaksi Enzimatis Kitin Deasetilasi Isolate Bacillus Papandayan K29-14. Makalah Seminar Nasional dan Kongres PATPI. 2004.
23. Candra P. Kitosan dari Cangkang Udang dan Aplikasi Kitosan Sebagai Bahan Antibakteri pada Kain Katun. Skripsi. Jogjakarta : Fakultas Mipa dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Gajah Mada. 2008.