

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektifitas kitosan hasil deasetilasi kulit udang terhadap *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa.). Kulit udang yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari pabrik pengolahan udang beku di Semarang, Jawa Tengah. Kulit udang tersebut lalu dikeringkan dan diproses menjadi kitosan di laboratorium teknik kimia, Politeknik Negeri Malang. Kitosan diproses dengan terlebih dahulu dilakukan deproteinasi untuk menghilangkan protein dengan NaOH 3,5% sehingga menjadi *crude chitin*. Kemudian dilakukan demineralisasi untuk menghilangkan mineral dengan HCl 1 N sehingga menjadi serbuk kitin. Setelah itu dilakukan deasetilasi untuk menghilangkan gugus asetil dari kitin, menggunakan NaOH 50% sehingga menjadi serbuk kitosan (Teng, 2012; Tolaimate 2003). Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* didapatkan dari laboratorium mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Surabaya yang ditanamkan pada BHIA. Hasil penelitian ini diperoleh dengan mengamati kadar bunuh minimum (KBM) dengan menghitung jumlah koloni bakteri pada agar yang telah *distriking* dari tabung berisi kitosan dan bakteri.

Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sebelumnya diuji terlebih dahulu untuk menentukan apakah bakteri tersebut benar merupakan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Hasil pewarnaan menunjukkan bakteri merupakan bakteri Gram negatif berbentuk kokobasil, dimana *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* memang merupakan bakteri Gram negatif karena berwarna merah dan berbentuk kokobasil (Saito, 2014). Hasil uji *Microbact*[™] juga menunjukkan hasil bahwa bakteri yang diuji benar *Aggregatibacter*

actinomycetemcomitans. Hasil tersebut ditunjang dengan kunci uji katalase positif, uji laktosa negatif, uji sukrosa negative dan ONPG yang positif (Norskov *et al.*, 2006). Uji lain yang juga menunjukkan bahwa bakteri tersebut benar *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* adalah hasil tes oksidase yang positif, agar yang tidak berubah warna pada uji *MacConkey*, pada uji hemolisis menunjukkan bahwa γ^- hemolisis (Norskov *et al.*, 2006).

Telah dilakukan berbagai uji pendahuluan sebelum penelitian utama dilakukan. Uji sumuran menunjukkan bahwa kitosan tidak memiliki daya difusi yang baik sehingga memerlukan penggantian metode menjadi metode dilusi. Metode dilusi yang pertama dilakukan adalah dilusi agar, mengingat partikel kitosan yang besar dan dikhawatirkan akan mudah mengendap jika dilakukan dilusi tabung. Hasil uji pendahuluan dengan dilusi agar sebanyak menunjukkan bahwa kitosan tidak dapat terdistribusi dengan baik pada agar, sehingga tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Uji pendahuluan selanjutnya adalah dengan menggunakan dilusi tabung. Metode ini menggunakan medium cair dan medium padat. Kitosan menyebabkan kekeruhan pada medium cair sehingga kadar hambat minimal (KHM) tidak dapat dievaluasi, namun kadar bunuh minimum (KBM) ternyata masih dapat dievaluasi dengan inokulasi medium cair hasil inkubasi ke dalam medium padat. Berdasarkan seluruh penelitian pendahuluan yang telah dilakukan maka disimpulkan bahwa penelitian utama dapat dilakukan untuk menguji kadar bunuh minimum (KBM) kitosan terhadap bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dengan uji dilusi tabung. Konsentrasi yang digunakan

untuk pengulangan pada penelitian utama adalah 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%. Dasar penggunaan konsentrasi ini dapat dilihat pada Bab 5.

Uji pengulangan yang dilakukan adalah sebanyak tiga kali pada setiap kelompoknya. Pengamatan yang dilakukan menunjukkan bahwa kitosan hasil deasetilasi kulit udang (*Penaeus sp.*) terhadap *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* mampu menurunkan jumlah koloni bakteri dengan rata-rata jumlah koloni bakteri pada konsentrasi 40% sebanyak 122, pada konsentrasi 45% sebanyak 87, pada konsentrasi 50% sebanyak 33,67; pada konsentrasi 55% sebanyak 5,67; pada konsentrasi 60% sebanyak 1 dan pada konsentrasi 65% sebanyak 0 koloni. Kontrol positif klorheksidin menunjukkan rata-rata koloni sebanyak 0 sedangkan kontrol negatif menunjukkan rata-rata jumlah koloni sebanyak 233,67. Hal ini berarti semakin besar konsentrasi kitosan yang diberikan, semakin sedikit jumlah koloni bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang terbentuk. Berdasarkan hasil penelitian, didapatkan bahwa kadar bunuh minimum (KBM) terdapat pada konsentrasi 65%, sedangkan untuk pengamatan kadar bunuh minimum (KHM) tidak bisa dilakukan. Pengamatan KHM tidak bisa dilakukan karena warna larutan kitosan yang sangat keruh dan mengendap sehingga KHM tidak bisa diamati.

Daya antimikroba kitosan konsentrasi 65% dapat dikatakan kuat karena sama-sama memiliki rata-rata jumlah koloni sebanyak 0 jika dibandingkan dengan klorheksidin. Hal ini menandakan bahwa kitosan dengan konsentrasi 65% efektif sebagai antimikroba walaupun ada perbedaan konsentrasi yang cukup besar antara klorheksidin glukonat yang hanya membutuhkan konsentrasi sebesar 0,2% untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Klorheksidin glukonat pada konsentrasi tinggi ($> 73 \mu\text{g/ml}$) efektif terhadap bakteri Gram negatif dan

fungi , sedangkan pada konsentrasi rendah ($> 1 \mu\text{g/ml}$) efektif terhadap bakteri Gram positif (Nayyar, 2015). Konsentrasi 0,2% yang dipakai mengandung 20 mg klorheksidin dalam 10 ml pelarut dimana termasuk dalam konsentrasi tinggi. Penggunaan konsentrasi 0,2% dipilih untuk memaksimalkan efektifitas dengan mengurangi efek samping sebagai obat kumur (Balagopal, 2013; Dutt, 2014).

Uji *One Way ANOVA* menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara kedelapan kelompok perlakuan karena nilai p sebesar 0,000 ($p < 0,005$). Hasil uji korelasi *Pearson* menunjukkan kekuatan korelasi sebesar 0,951 dengan arah korelasi negatif. Korelasi tersebut bermakna bahwa semakin besar konsentrasi kitosan hasil deasetilasi kulit udang, maka semakin sedikit jumlah koloni bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang tumbuh. Uji regresi menunjukkan bahwa pengaruh pemberian kitosan terhadap penurunan jumlah koloni bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* adalah sebesar 90,4%. Sisanya 9,6% merupakan faktor-faktor lain yang tidak diteliti yang juga mempengaruhi hasil penelitian.

Penurunan jumlah koloni bakteri yang teramati sebagai KBM disebabkan karena beberapa mekanisme kitosan sebagai antimikroba. Kitosan dapat memiliki efek antimikroba akibat adanya interaksi muatan positif kitosan dengan muatan negatif pada membran sel bakteri, yang meningkatkan permeabilitas membran sel bagian luar. Hal ini akan menyebabkan hilangnya komponen penyusun membran sel bagian luar seperti protein, lipopolisakarida, dan fosfolipid. Hasil dari proses tersebut adalah gangguan transportasi zat transmembran yang menghambat metabolisme mikroorganisme dan akhirnya mengakibatkan kematian sel (Kurniasih dkk., 2009). Mekanisme lain yang dapat terjadi adalah kitosan membentuk sebuah lapisan yang menghalangi bakteri

untuk melakukan transport nutrisi melalui membran sel sehingga menghambat metabolisme sel. Hasil dari proses ini adalah kematian sel (Kim *et al.*, 2014).

Klorheksidin sebagai antimikroba memiliki mekanisme kerja yang mirip dengan kitosan, yaitu berinteraksi dengan membran sel bakteri. Interaksi ini menyebabkan meningkatnya permeabilitas membran dan menyebabkan lisisnya sel bakteri (Balagopal, 2013; Gupta, 2012). Penggunaan klorheksidin telah diketahui memiliki beberapa efek samping seperti perubahan pada indera perasa, perubahan warna pada gigi dan membran mukosa. Hal ini sangat berbeda dengan efek samping dari kitosan yang sangat minimal. Alergi udang tidak dipicu oleh kitosan namun karena konsumsi daging udang (Margaret *et al.*, 2015). Hal ini mengindikasikan bahwa kitosan aman dikonsumsi walaupun pasien memiliki riwayat alergi udang, namun hal ini masih memerlukan penelitian lebih lanjut.

Keterbatasan yang pertama dari penelitian ini adalah ukuran partikel kitosan yang digunakan. Ukuran kitosan yang digunakan pada penelitian ini masih kurang kecil. Semakin kecil ukuran partikel kitosan maka semakin luas permukaannya, selain kitosan menjadi semakin mudah larut dan semakin mudah masuk ke dinding sel bakteri untuk berinteraksi dengan membran sel. Keterbatasan yang kedua adalah tidak dilakukannya evaluasi apakah lama penyimpanan kitosan berpengaruh dengan efektivitas antimikrobanya. Keterbatasan lain yang ditemui adalah pemilihan pelarut kitosan. Pelarut CMC (*carboxymethyl cellulose*) yang digunakan adalah dengan rasio 1:2 untuk meningkatkan kemampuan kitosan larut dalam air. Walaupun asam asetat telah terbukti tidak dapat digunakan sebagai pelarut (karena juga memiliki efek

antimikroba terhadap *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) namun belum dilakukan perbandingan dengan pelarut-pelarut lainnya dalam berbagai rasio.

Penelitian ini menunjukkan bahwa kitosan hasil deasetilasi kulit udang (*Penaeus sp.*) mampu berperan sebagai antimikroba dengan efektivitas yang sama seperti klorheksidin. Konsentrasi efektif yang sebaiknya digunakan adalah konsentrasi 65% karena dalam penelitian ini konsentrasi 65% merupakan kadar bunuh minimum (KBM). Penelitian ini diharapkan bermanfaat sebagai referensi untuk penelitian lebih lanjut dalam bidang mikrobiologi dan periodontologi sebagai alternatif obat dengan efek samping yang minimal. Penelitian ini masih perlu penelitian lebih lanjut agar dapat diaplikasikan langsung kepada manusia sebagai alternatif obat yang aman pada penderita periodontitis agresif akibat *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

