

Uji Antibakteri Nanopartikel Kitosan terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.
(Antibacterial Test of Chitosan Nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*)

Alce K. Magani*, Trina E. Tallej, Beivy J. Kolondam
Program Studi Biologi, FMIPA Universitas Sam Ratulangi, Manado 95115

*Email korespondensi: alcemagani@gmail.com

(Article History: Received 30-12-2019; Revised 15-01-2020; Accepted 23-01-2020)

Abstrak

Antibakteri merupakan zat yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri dan dapat membunuh bakteri penyebab infeksi. *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* merupakan bakteri Gram positif dan Gram negatif yang dapat menimbulkan infeksi atau penyakit dalam tubuh. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas bakteri patogen dengan memakai nanopartikel kitosan sebagai antibakteri yang dibuat dalam empat konsentrasi (0,5%, 1%, 1,5% dan 2%) serta penggunaan kontrol asam asetat 1%, ciprofloxacin dan air steril sebagai pembanding. Metode penelitian yang digunakan yaitu metode gelas ionik untuk pembuatan nanopartikel kitosan dan difusi agar untuk pengujian antibakteri. Data dianalisis dengan One Way Anova yang dilanjutkan dengan metode BNT (Beda Nyata Terkecil). Hasil penelitian diperoleh penghambatan pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *E. coli* tertinggi pada konsentrasi 0,5%, dengan diameter zona hambat hari pertama sampai hari ketiga 12,31 mm, 9,98 mm, dan 20,46 mm pada *S. aureus* dan 15,88 mm, 18,71 mm, dan 20,43 mm pada *E. coli*, kategori kuat, dan bersifat bakteriostatik dan penghambatan terendah pada konsentrasi 2% dengan diameter zona hambat pada *S. aureus* yaitu 5,56 mm, 5,50 mm, dan 5,40 mm, dan pada *E. coli* yaitu 5,93 mm, 9,64 mm, dan 12,58 mm, kategori sedang, dan bersifat bakteriostatik. Kata kunci: Kitosan, nanopartikel kitosan, aktivitas antibakteri.

Abstract

Antibacteria is a substance that can inhibit the growth of bacteria and able to kill bacteria that cause infections. *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* are Gram positive and Gram negative bacteria that able to cause infections or diseases. This study aimed to examine the activity of pathogenic bacteria by using chitosan nanoparticles as antibacterial. The treatments were made in four concentrations (0.5%, 1%, 1.5% and 2%) and, for comparison, there were also acetic acid control, ciprofloxacin and sterile water. The research method used is the ionic gelation method for the manufacture of chitosan nanoparticles and agar diffusion for antibacterial testing. Data were analyzed with One Way Anova followed by LSD (Least Significant Difference) method. The results showed the highest inhibition of growth of *S. aureus* and *E. coli* bacteria at a concentration of 0.5%, with a diameter of inhibition zones of the first day to the third day of 12.31 mm, 9.98 mm, and 20.46 mm in *S. aureus* and 15,88 mm, 18,71 mm, and 20,43 mm in *E. coli*, the strong category, and are bacteriostatic and the lowest inhibition was at 2% concentration with inhibition zone diameters in *S. aureus* namely 5.568 mm, 5.50 mm, and 5, 40 mm, and in *E. coli*, 5.93 mm, 9.63 mm and 12.58 mm, the medium category and bacteriostatic.

Key words: Chitosan, nanoparticles chitosan, antibacterial activity.

PENDAHULUAN

Bakteri penyebab infeksi dan penyakit banyak ditemui di lingkungan sekitar kita termasuk bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* yang juga merupakan

bakteri Gram positif dan Gram negatif. Penyakit pneumonia, luka, radang paru-paru, dan endokarditis atau sepsis adalah infeksi dan penyakit yang dihasilkan oleh bakteri *S. aureus* (Angelica 2013). Bakteri

ini dapat bertahan hidup pada lingkungan yang mengandung garam dengan konsentrasi yang tinggi. Bakteri *S. aureus* mudah berkembangbiak karena dapat bertumbuh pada suhu optimum sekitar 30°C (Mustika 2018).

Selain bakteri *S. aureus* bakteri *E. coli* juga merupakan bakteri penyebab infeksi dan penyakit yang bersifat patogen. *E. coli* ditemukan di dalam usus manusia yang berperan dalam proses pengeluaran zat sisa pada saluran pencernaan dan dapat menginfeksi usus sehingga menimbulkan diare (Puteri dan Milanda 2017).

Pertumbuhan bakteri penyebab infeksi dan penyakit perlu dihambat dengan antibakteri. Antibakteri merupakan zat yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri dan dapat membunuh bakteri patogen (Paju et al. 2013). Antibakteri dibedakan menjadi dua yaitu bakteriostatik yang menekan pertumbuhan bakteri dan bakterisidal yang dapat membunuh bakteri (Safitri 2016).

Kitosan memiliki sifat antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen dan mikroorganisme pemusuk termasuk bakteri Gram positif dan Gram negatif (Hafdani 2011). Adanya polikation yang bermuatan positif kitosan dapat menekan pertumbuhan bakteri penyebab penyakit (Mardy 2016). Kitosan sekarang banyak diolah oleh para ahli menjadi ukuran nanopartikel yang berkisar 100-400 nm.

Kemampuan kitosan yang diolah menjadi nanokitosan memiliki kemampuan adsorpsi yang lebih baik dikarenakan memiliki permukaan yang spesifik dan ukurannya yang lebih kecil (Sivakami et al. 2013). Nanokitosan yang berukuran kecil dapat dengan mudah masuk dalam sel bakteri (Cauerhff et al. 2013).

Beberapa penelitian aktivitas antibakteri nanopartikel kitosan memanfaatkan bahan ekstrak etanol daun pugun tanah (*Picria fel-terrae* Lour.) dalam menghambat pertumbuhan bakteri bekerja efektif baik dalam sediaan ekstrak kental maupun dalam bentuk nanopartikel (Mustika 2018). Juga pemanfaatan kitosan dalam produk pangan antibakteri kitosan menunjukkan bahwa konsentrasi 0,5% dan 1% kitosan dapat menghambat pertumbuhan bakteri pada ikan asin yang

telah dikeringkan dengan aktivitas penghambatan yang baik (Killay 2013).

Aktivitas antibakteri nanopartikel kitosan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *E. coli* belum pernah dipublikasikan sehingga dilakukan penelitian uji antibakteri nanopartikel kitosan terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *E. coli* dengan menggunakan metode gelasi ionik dan difusi agar. Penelitian ini bertujuan untuk menguji efektivitas antibakteri nanopartikel kitosan pada pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *E. coli*.

METODE

Sterilisasi alat

Untuk melakukan penelitian, beberapa alat cawan petri, labu Erlenmeyer, jarum Oose, gelas ukur, dan pengaduk magnetik yang digunakan, terlebih dahulu disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit dengan menggunakan autoklaf.

Pembuatan nanopartikel kitosan dengan metode gelasi ionik

Pembuatan larutan stok, yaitu 2 gr kitosan dilarutkan dengan asam asetat 1% sampai 100 mL diaduk pada suhu ruang selama tiga jam pada kecepatan 1500 rpm sehingga didapati konsentrasi 2% selanjutnya dilakukan pengenceran untuk mendapatkan konsentrasi 1,5%, 1%, dan 0,5% kemudian disterilisasi (pastikan semua konsentrasi memiliki pH 6). Pengenceran dibuat menggunakan rumus:

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

Dimana:

M_1 = Konsentrasi awal

M_2 = Konsentrasi yang ingin dibuat

V_1 = Volume yang diperlukan

V_2 = Volume yang akan dibuat

Perlakuan penelitian

Konsentrasi kitosan yang digunakan adalah 0,5%, 1% 1,5% dan 2% (w/v), kontrol asam asetat 1%, *ciprofloxacin*, dan air steril. Pengujian aktivitas antibakteri nanopartikel kitosan dilakukan menggunakan metode difusi agar yang dimodifikasi (Murhadi 2002).

Pengujian antibakteri nanopartikel kitosan dengan metode difusi agar

Cawan petri yang dilengkapi pencadangan 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 pencadangan dikeluarkan sehingga diperoleh sumur-sumur yang berdiameter 5 mm. selanjutnya penuangan antibakteri nanopartikel kitosan dan kontrol pembanding kedalam sumur masing-masing sebanyak 200 µL setelah itu dimasukkan kedalam inkubator pada suhu 37°C selama 3x24 jam, kemudian dilakukan pengamatan zona bening atau zona hambat setiap 24 jam.

Perhitungan zona hambat

Zona hambat antibakteri dari nanopartikel kitosan diukur berdasarkan jari-jari (r_p , mm) dan penghambatnya berupa areal bening di sekeliling sumur uji. Pengukuran jari-jarinya dilakukan dengan mengukur jarak dari tepi sumur uji ke batas lingkaran zona hambat (ketelitian 0,05 mm), pada beberapa sisi sumur uji, lalu dirata-ratakan (Murhadi 2002). Penghitungan luas zona hambat mengikuti prosedur Adam *et al.* (2014).

$$\text{Rumus, } D = \frac{d_1 + d_2}{2}$$

Dimana:

D = diameter Antibakteri nanopartikel kitosan

d1 = diameter vertikal antibakteri nanopartikel kitosan

d2 = diameter horizontal antibakteri nanopartikel kitosan

Analisis Data

Data diambil dari hasil pengamatan dan pengukuran diameter zona hambat pada tiap-tiap konsentrasi antibakteri nanopartikel kitosan. Analisis secara statistic dengan aplikasi SPSS dan microsoft Excel untuk melihat potensi antibakteri nanopartikel kitosan dengan berbagai konsentrasi terhadap pertumbuhan

bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Nanopartikel Kitosan pada *Staphylococcus aureus*

Diameter zona hambat diperoleh dari pengamatan aktivitas antibakteri nanopartikel kitosan dalam menekan pertumbuhan bakteri *S. aureus* yang dilakukan selama 3x24 jam berturut-turut. Hasil menunjukkan bervariasi dari masing-masing konsentrasi nanopartikel kitosan dan kontrol pembanding yang dipakai (Tabel 1) . Zona hambat yang diperoleh pada hari pertama lebih tinggi dibandingkan pada saat pengamatan hari kedua.

Tabel 1. Diameter zona Hambat (mm) pada Pengamatan 3x24 Jam pada Uji Antibakteri Nanopartikel Kitosan dengan beberapa Konsentrasi terhadap *S. aureus*

Konsentrasi	Rata-rata diameter zona hambat (mm)		
	Hari 1	Hari 2	Hari 3
0,5%	12,31	9,98	20,46
1%	9,81	8,71	1,77
1,5%	5,94	5,88	10,77
2%	5,56	5,50	5,40
Asam asetat 1%	8,89	7,90	6,83
Ciprofloxacin	29,22	33,39	33,10
Air Steril	0	0	0

Konsentrasi 0,5% memiliki daya hambat yang cukup kuat setelah kontrol *ciprofloxacin* dalam menekan pertumbuhan bakteri uji. Hal tersebut dibuktikan dalam penelitian Killay (2013) bahwa kitosan dengan konsentrasi 0,5% memiliki daya penghambatan yang kuat.

Konsentrasi 2% nanopartikel kitosan memiliki daya hambat terendah. Hal ini terjadi karena kandungan kitosan yang dimiliki oleh konsentrasi 0,5% lebih sedikit dibandingkan dengan konsentrasi 2%

(lebih kental), sehingga proses berdifusi konsentrasi 0,5% lebih baik dibandingkan dengan konsentrasi 2%, dan kemampuan menekan pertumbuhan bakteri ukipun terpengaruh karena cepat lambatnya antibakteri berkerja, hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Nurainy et al. (2008).

Analisis statistik *one way anova* memperoleh hasil bahwa F hitung (36,76) > F tabel 5% (2,84). Hasil tersebut kemudian dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT 5%) dalam bentuk notasi. Hasil pembuatan notasi konsentrasi 0,5% berbeda nyata dengan konsentrasi 1,5%, dan konsentrasi 2% tetapi tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 1%. Hal ini dikarenakan kemampuan penghambatan konsentrasi 0,5% lebih besar dari konsentrasi 1,5% dan konsentrasi 2% (Tabel 2).

Tabel 2. Perbandingan uji BNT konsentrasi antibakteri nanopartikel kitosan dan kontrol pembanding dalam menekan pertumbuhan bakteri *S. aureus*.

Konsentrasi	Rata-rata diameter	Notasi
air steril	0	a
2%	5,49	b
1,5%	7,53	b
asam asetat 1%	7,87	b
1%	11,43	bc
0,5%	14,25	c
<i>Ciprofloxacin</i>	31,90	d

Aktivitas Antibakteri Nanopartikel Kitosan pada *E.coli*

Hasil pengujian aktivitas antibakteri nanopartikel kitosan yang dilakukan selama 3x24 jam dalam menekan pertumbuhan bakteri *E. coli* menunjukkan variasi nilai diameter tiap konsentrasi. Pengukuran diameter zona hambat sampai pada lama inkubasi 72 jam terus mengalami peningkatan (Tabel 3). Hal ini disebabkan muatan positif dari nanopartikel kitosan berinteraksi dengan muatan negatif membran sel bakteri *E. coli* yang menyebabkan kerusakan membran luar sel dan keluarnya konstituen

intaseluler bakteri uji (Suherman et al. 2018; Nurainy et al. 2008).

Tabel 3. Diameter zona hambat (mm) antibakteri nanopartikel kitosan terhadap *E. coli* pada pengamatan 3x24 jam.

Konsentrasi	Rata-rata diameter zona hambat		
	Hari 1	Hari 2	Hari 3
0,5%	15,88	18,71	20,43
1%	12,61	14,84	18,42
1,5%	9,50	12,71	15,65
2%	5,93	9,64	12,58
Asam asetat 1%	6,59	7,11	6,19
<i>Ciprofloxacin</i>	32,73	41,07	34,69
Air Steril	0	0	0

Daya hambat tertinggi pada konsentrasi 0,5% sedangkan daya hambat terendah yaitu konsentrasi 2%. Hal ini dikarenakan kandungan kitosan konsentrasi 2% lebih kental dari konsentrasi 0,5% sehingga proses penghambatan pertumbuhan bakteri *E. coli* melambat karena proses berdifusi dalam media NA yang berisi bakteri uji cukup lama dibandingkan konsentrasi 0,5% yang penghambatannya bekerja lebih baik dan sangat kuat dalam menekan pertumbuhan bakteri *E. coli*.

Nilai diameter yang diperoleh dilanjutkan dengan menganalisis statistik *one way anova* dengan tujuan melihat perbandingan antara F hitung dan F tabel 5%. Hasil analisis *one way anova* menunjukkan bahwa nilai F hitung (51,19) > F tabel 5% (2,84). Hasil ini membuktikan bahwa adanya perbedaan secara signifikan pola penghambatan dari tiap konsentrasi sehingga dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT 5%), dalam bentuk notasi untuk melihat perbedaannya (Tabel 4).

Hasil uji BNT 5% memperlihatkan bahwa konsentrasi 0,5% berbeda nyata dengan konsentrasi 2%, dan konsentrasi 1,5%, tetapi tidak berbeda nyata dengan

konsentrasi 1% Hal ini disebabkan penghambatan yang diperoleh dari konsentrasi 0,5% lebih besar dari konsentrasi 2%, dan konsentrasi 1,5%, akan tetapi meskipun konsentrasi 1% juga memiliki kemampuan penghambatan pertumbuhan bakteri *E. coli* lebih kecil dari konsentrasi 0,5% namun hal tersebut tidak membuktikan bahwa keduanya berbeda secara nyata setelah dilakukan pengujian BNT 5%,

Tabel 4. Uji BNT 5% antibakteri nanopartikel kitosan pada *E. coli*.

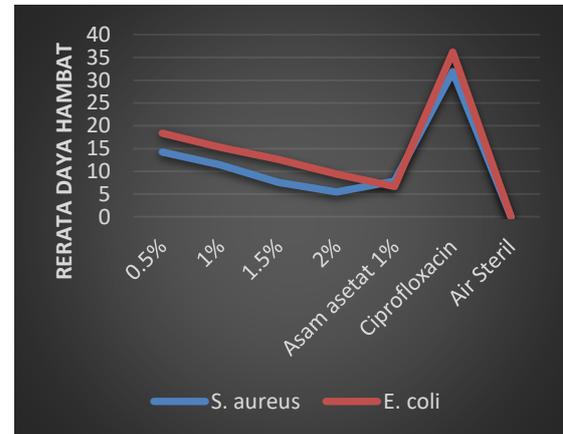
Konsentrasi	Rata-rata diameter	Notasi
Air Steril	0	a
Asam asetat		
1%	6,63	b
2%	9,38	bc
1,5%	12,62	cd
1%	15,29	de
0,5%	18,34	e
Ciprofloxacin	36,16	f

Perbandingan Daya Hambat Antibakteri Nanopartikel Kitosan pada *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

Berdasarkan pengujian antibakteri nanopartikel kitosan terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli* diperoleh hasil bahwa kemampuan antibakteri nanopartikel kitosan kitosan bekerja lebih efektif dalam menekan pertumbuhan bakteri *E. coli* dibandingkan pada *S. aureus*. Hal ini dibuktikan dalam penelitian Suherman *et al.* (2018), bahwa kitosan mempunyai muatan positif yang kuat yang dapat mengikat muatan negatif dari senyawa lain atau berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri karena sifat utamanya adalah antibakteri.

Proses penghambatan antibakteri nanopartikel kitosan lebih tinggi dan terus meningkat dalam inkubasi selama 3x24 jam dalam penekanan pertumbuhan bakteri *E. coli* dibandingkan bakteri *S. aureus* setelah kontrol ciprofloxacin

(Gambar 1). Penghambatan tertinggi pada konsentrasi 0,5%, dan penghambatan terendah pada konsentrasi 2%, baik pada *E. coli* ataupun pada *S. aureus*. Hal ini telah dibuktikan oleh penelitian Nurainy *et al.* (2008), dimana konsentrasi lebih kecil memiliki potensi lebih besar dalam menghambat pertumbuhan bakteri.



Gambar 1. Grafik Perbandingan *S.aureus* dan *E.coli*

Hasil pengujian antibakteri dari nanopartikel kitosan dapat dikatakan berhasil dalam menekan pertumbuhan bakteri penyebab infeksi dan penyakit atau bakteri patogen pada lama pengujian selama 3x24 jam. Hal ini mendukung pernyataan Hafdani (2011) dan Killay (2013), bahwa kitosan memiliki sifat antibakteri dan juga berpotensi untuk menekan pertumbuhan bakteri patogen yang termasuk antibakteri bakteriostatik.

KESIMPULAN

Konsentrasi antibakteri nanopartikel kitosan dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Penghambatan yang terbesar terhadap pertumbuhan bakteri yaitu konsentrasi 0,5% yang memiliki kemampuan menghambat atau daya hambatnya bekerja sangat baik dibandingkan dengan konsentrasi lainnya. Zona hambat yang dihasilkan oleh antibakteri nanopartikel kitosan bekerja lebih efektif dalam menghambat bakteri *E. coli* dibandingkan dengan *S. aureus*. Antibakteri nanopartikel kitosan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S.*

aureus dan *E. coli* bersifat bakteriostatik dimana antibakteri ini berhasil menekan atau mencegah pertumbuhan bakteri uji.

DAFTAR PUSTAKA

- Adam AA, Posangi J, Tumewu E, Tallei TE (2014) Aktivitas antibakteri ekstrak kasar tunikata *Polycarpa aurata* terhadap *Streptococcus mutans*. *Dentire J* 3(2):118-122.
- Angelica N (2013) Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun dan Kulit Batang Kayu Manis (*Cinnamomum burmannii* (Nees & Th. Nees)) terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Calyptra* 2(2):1-8.
- Cauerhff A, Yanina, NM, German AI, Guillermo RC (2013) *Nanotoxicology and Nanomedicine*. Chapter 2. New York: Springer.
- Hafdani FN, Sadeghinia N (2011) *A Review on Application of Chitosan as a Natural Antimicrobial*. World Academy of Science. Engineering and Technology.
- Harahap Y (2012) Preparasi dan Karakterisasi Nanopartikel Kitosan dengan Variasi Asam. Fakultas Teknil UI. Depok.
- Killay A (2013) Kitosan sebagai Antibakteri pada Bahan Pangan yang Aman dan Tidak Berbahaya. *Prosiding FMIPA Universitas Pattimura*.
- Lay BW, Sugyo H (1992) *Mikrobiologi Edisi ke satu*. Jakarta: Cetakan kesatu. Rajawali Press.
- Mardy DC, Sudjari S, Rahayu SI (2016) Perbandingan Efektivitas Kitosan (2-Acetamido-2-Deoxy-D-Glucopyranose) dan Nano Kitosan terhadap Pertumbuhan Bakteri *Enterococcus faecalis* secara *In Vitro*. *Majalah Kesehatan FKUB* 2(4):229-240.
- Murhadi (2002) Isolasi dan Karakteristik Komponen Antibakteri dan Biji Atung (*Parinarium glaberrimum* Hassak). Program Pascasarjana IPB, Bogor.
- Mustika N (2018) Pembuatan Nanopartikel dari Ekstrak Etanol Daun Pugun Tanah (*Picria fel-terrae* Lour) dan Uji Antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Nurainy F, Samsul R, Yudiantoro. (2008) Pengaruh Konsentrasi Kitosan terhadap Aktivitas Bakteri dengan Metode Difusi Agar (sumur). *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertamina* 13(2):120-124.
- Paju N, Yamlean PV, Kojong N (2013). Uji Efektivitas Salep Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia* Steenis.) pada Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) yang Terinfeksi Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Pharmacon* 2(1):51–61.
- Puteri T, Milanda T (2017) Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Lidah Buaya (*Aloe vera* L.) terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Farmaka*, 14(2):9-17.
- Safitri AU (2016) Aktivitas Antibakteri Nanopartikel Kitosan Berbasis Cangkang Lobster terhadap Bakteri. *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis*. FPIK IPB. Bogor
- Sivakami MS, Thandapani, G (2013) Preparation and Characterization of Nano Chitosan for Treatment Wastewaters. In *journal of biological macromolecules* 57:204-211.
- Suherman B, Muhdar L, Sisilia TRD (2018) Potensi kitosan kulit udang vannemei (*Litopenaeus vannamei*) sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Propionibacterium agnes*, dan *Escherichia coli* dengan metode difusi cakram kertas. *Jurnal Media Farmasi*. 14(1):124-125.