

Antibiofilm Efficacy of Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) Chitosan against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Treponema denticola* Efikasi Antibiofilm Kitosan Udang Windu (*Penaeus monodon*) terhadap *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dan *Treponema denticola*

Kresna A. G. Samudra,¹ Abdul G. Soulissa,² Armelia S. Widyarman³

¹Program Studi Pendidikan Dokter Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti, Jakarta, Indonesia

²Departemen Ilmu Kedokteran Gigi Masyarakat dan Pencegahan, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti, Jakarta, Indonesia

³Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti, Jakarta, Indonesia
Email: abdul@trisakti.ac.id

Received: February 15, 2022; Accepted: May 27, 2022; Published on line: June 6, 2022

Abstract: Shrimp shell (carapace) contains chitosan which is reported to have antibacterial property against periodontal bacteria. This study aimed to determine the antibiofilm efficacy of chitosan obtained from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Treponema denticola* *in vitro*. The antibiofilm activity was tested using crystal violet biofilm assay with variations of chitosan concentrations, as follows: 0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8%, and 1%. Chlorhexidine 0.2% was used as the positive control and acetate 1% as the negative control with 3-hour-treatment period. The biofilm optical density was analyzed using microplate reader with 490 nm wavelength. Data were analyzed statistically using One Way-ANOVA with the significance level of $p < 0.05$. The result showed that all concentrations of chitosan were able to inhibit the biofilm formation of *A. actinomycetemcomitans* and *T. denticola*. The most effective concentration was 0.6% for both bacteria. In conclusion, *Penaeus monodon* chitosan has been proved to inhibit the biofilm formation of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Treponema denticola* *in vitro*. Further study is needed to confirm this result with other oral bacteria.

Keywords: chitosan of *Penaeus monodon*; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *Treponema denticola*; biofilm

Abstrak: Limbah kulit udang (*carapace*) mengandung kitosan yang memiliki sifat antibakteri yang dapat digunakan untuk melawan bakteri periodontal. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek antibiofilm dari kitosan udang windu (*Penaeus monodon*) terhadap *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dan *Treponema denticola* *in vitro*. Uji antibiofilm menggunakan metode *biofilm assay* dengan variasi konsentrasi kitosan: 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, dan 1%. Kontrol positif menggunakan klorheksidin 0,2% dan kontrol negatif menggunakan asetat 1% pada perlakuan waktu 3 jam. Pengukuran *optical density* biofilm menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 490 nm. Data dianalisis dengan menggunakan analisis sidik ragam satu arah dengan nilai kemaknaan $p < 0,05$. Hasil penelitian mendapatkan bahwa semua konsentrasi kitosan dapat mengurangi perlekatan pertumbuhan biofilm *A. Actinomycetemcomitans* dan *T. denticola*. Konsentrasi paling optimal ialah pada konsentrasi 0,6% untuk keduanya. Simpulan penelitian ini ialah kitosan *Penaeus monodon* mampu menghambat perlekatan pertumbuhan biofilm pada *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dan *Treponema denticola* secara *in vitro*. Dibutuhkan penelitian lebih lanjut untuk mengonfirmasi hasil ini menggunakan strain bakteri patogen rongga mulut lainnya.

Kata kunci: kitosan *Penaeus monodon*; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *Treponema denticola*; biofilm

PENDAHULUAN

Lautan menjadi hunian kira-kira setengah dari keanekaragaman hayati dunia. Hampir 70% permukaan bumi tertutupi oleh lautan, yang berarti hampir mencapai 90% dari biosfer.¹ Indonesia memiliki luas wilayah mencapai 5.180.054 km² yang terbagi menjadi dua, yaitu daratan sebesar 1.922.570 km² dan lautan 3.257.483 km².² Produksi total perikanan Indonesia dari perikanan tangkap dan budidaya pada tahun 2019 mencapai 23,67 juta ton.³ Pada tahun yang sama, produksi udang windu (*Penaeus Monodon*) ditargetkan mencapai 1.020.000 ton dengan nilai produksi 72,44 triliun pada tahun 2020.³ Udang *P. monodon* merupakan jenis yang banyak dibudidaya di Indonesia untuk kebutuhan ekspor, pasokan ke restoran, serta dikonsumsi; oleh karena itu diperkirakan limbah yang dihasilkan mencapai 35-50% dari berat tubuh udang.⁴

Kitosan diperoleh dari kitin, yang dapat diekstraksi dari *crustacea*, *fungi*, dan *insects*.⁵ Pada kedokteran gigi bahan yang terdapat pada kitosan memiliki sifat bioaktif, anti radang, hemostasis, pemulihan luka serta pemulihan tulang.⁶ Kitosan telah banyak dilirik oleh para peneliti dewasa ini karena meningkatnya kebutuhan akan bahan alam daripada bahan kimia dan biopolimer.

Kebersihan dan kesehatan rongga mulut sangat penting dalam mencegah terjadinya penyakit periodontal. Penyakit ini diawali dengan pembentukan biofilm oleh bakteri dengan hampir 700 variasi bakteri dominan.⁷ Setiap individu diperkirakan membawa sekitar 50-200 spesies.⁸ Bakteri ini diringkas dengan *microbiome* yang berkaitan dengan kesehatan dan penyakit mulut.⁷ Menurut WHO (*World Health Organization*), 10% dari populasi dunia menderita penyakit periodontal, yang dapat diperparah oleh sejumlah faktor seperti buruknya kebersihan mulut, merokok tembakau, diabetes, obat-obatan, usia, keturunan, dan obesitas.⁹

Penyakit periodontal disebabkan oleh bakteri periodontal yang terdapat pada plak dan dapat berkembang menjadi infeksi kronis pada jaringan lunak dan keras pada daerah sekitar gigi.¹⁰ Namun, etiologi penyakit ini sangat rumit dan multifaktorial. Faktor dasar

dari etiologi infeksi penyakit ini ialah spesies bakteri (*periodontal pathogens*) yang terga-bung dalam komunitas biofilm.¹⁰ Organisme pada *red complex* (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, dan *Treponema denticola*) sering ditemukan pada waktu plak berdekatan dengan jejas periodontal.¹¹ Hasil studi epidemiologi pada beberapa bagian dunia, menunjukkan bahwa kolonisasi rongga mulut oleh spesies tertentu dari bakteri periodontal yang termasuk *A. Actinomyces-temcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, dan *Campylobacter rectus* menyebabkan prevalensi lebih tinggi pada individual yang memiliki penyakit periodontal destruktif.¹¹ Pada periodontitis umumnya ditemukan bakteri Gram negatif yang berhubungan dengan gingivitis, sedangkan pada pasien dengan periodontitis kronik bakteri yang menunjukkan kadar tinggi ialah *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *C. rectus*, *A. Actinomyces-temcomitans*, *P. micra*, *E. nodatum*, *Leptotrichia buccalis*, dan *Treponema denticola*.¹²

Penelitian yang dilakukan oleh Achmad et al¹³ melaporkan bahwa kitosan gel dari sisik bandeng dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomyces-temcomitans* dan *Porphyromonas gingivalis*. Pada penelitian yang dilakukan oleh Khan et al¹⁴ didapatkan bahwa kitosan merupakan bahan yang efektif untuk menghambat pertumbuhan dan pembentukan biofilm secara luas. Namun sejauh ini, belum ada penelitian yang menganalisis sifat antibiofilm kitosan yang berasal dari udang *P. monodon* terhadap bakteri *A. Actinomyces-temcomitans* dan *T. denticola* sebagai bakteri penyebab penyakit periodontal. Hal ini mendorong penulis untuk mengetahui lebih lanjut mengenai efikasi antibiofilm kitosan udang windu (*Penaeus monodon*) terhadap *Aggregatibacter actinomyces-temcomitans* dan *Treponema denticola*

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium MiCORE Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti Jakarta pada bulan Januari 2022. Jenis penelitian ini ialah eksperimental laboratorik secara *in vitro* untuk melihat pengaruh kitosan *Penaeus monodon*

terhadap biofilm *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dan *Treponema denticola*.

Pada pembuatan ekstrak kitosan, bahan yang digunakan pada penelitian didapatkan secara komersial dengan sertifikasi HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points*) dan GMP (*Good Manufacturing Practices*). Bahan baku yang digunakan ialah kulit udang windu (*P. monodon*) kering yang dihancurkan hingga menjadi serbuk. Proses deproteinasi menggunakan larutan NaOH yang kemudian diaduk, dibilas dengan akuades serta dikeringkan, dan demineralisasi menggunakan larutan HCl yang kemudian diaduk, dibilas dengan akuades serta dikeringkan, dan didapatkan hasil yaitu kitin. Kitin kemudian dimasukkan ke dalam proses deasetilasi dengan penambahan larutan NaOH 20% dan suhu 90-100°C, diaduk secara konstan selama 60 menit. Hasil yang berbentuk bubur ini disaring, dicuci dengan akuades kemudian dikeringkan, dan diperoleh kitosan bubuk, yang selanjutnya dilarutkan dengan cairan asetat 1% hingga mencapai konsentrasi yang dibutuhkan.

Untuk kultur bakteri digunakan biakan murni bakteri *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29522 atau *T. denticola* ATCC 35405 dikultur menggunakan media *Brain Heart Infusion Broth*, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dalam keadaan anerobik.

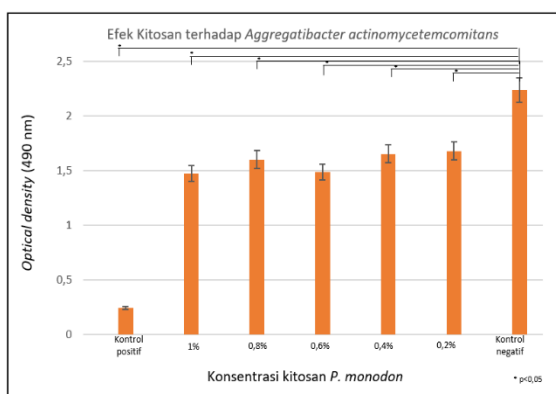
Uji biofilm dilakukan dengan metode

Crystal Violet Biofilm Assay menggunakan 96-well-plate. Masing-masing bakteri dimasukkan ke dalam sumuran (200µL) dan diinkubasi selama 24 jam, suhu 37°C, dalam suasana anaerob untuk membentuk biofilm. Kemudian diberikan perlakuan dengan kitosan berbagai konsentrasi (0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, dan 1%) dengan kontrol positif klorheksidin 0,2% dan kontrol negatif asetat 1% selama 3 jam. Densitas biofilm dikuantifikasi menggunakan *microplate reader* dengan panjang gelombang 490 nm.

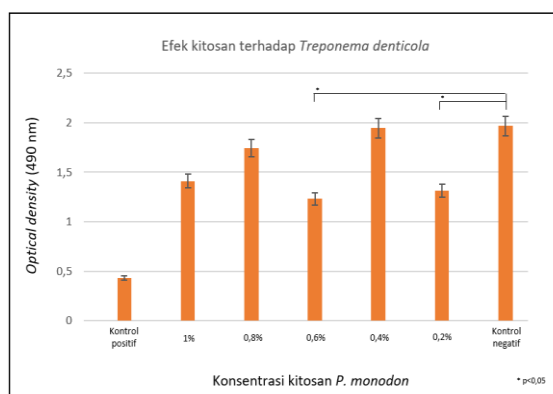
Data yang diperoleh dianalisis menggunakan uji normalitas Saphiro-Wilk. Oleh karena data terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan ANOVA satu arah dan *Post Hoc LSD*. Analisis statistik dilakukan menggunakan *software IBM SPSS Statistic 26*.

HASIL PENELITIAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kitosan *P. monodon* dapat menghambat perkembangan biofilm *A. actinomycetemcomitans* secara bermakna ($p < 0,05$). Konsentrasi paling efektif terlihat pada konsentrasi 0,6% tetapi tidak lebih efektif dibandingkan dengan kontrol positif (Gambar 1). Hasil serupa terlihat pada biofilm *T. denticola* yang juga dihambat secara bermakna ($p < 0,05$). Konsentrasi paling efektif terlihat pada konsentrasi 0,6% tetapi tidak lebih efektif dibandingkan kontrol positif (Gambar 2).



Gambar 1. Grafik hasil biofilm *A. actinomycetemcomitans* setelah diberikan perlakuan selama 3 jam dengan kitosan (konsentrasi 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, dan 1%), dengan kontrol positif klorheksidin 0,2% dan kontrol negatif asetat 1%.



Gambar 2. Grafik hasil biofilm *T. denticola* setelah diberikan perlakuan selama 3 jam dengan kitosan (konsentrasi 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, dan 1%) dengan kontrol positif klorheksidin 0,2% dan kontrol negatif asetat 1%.

BAHASAN

Pada hasil penelitian ini densitas biofilm *A. actinomycetemcomitans* terkecil terlihat pada konsentrasi 1% dengan nilai *optical density* sebesar $1,47 \pm 0,145$, yang jauh lebih rendah dibandingkan kontrol negatif (OD $2,23 \pm 0,334$); hal ini menunjukkan bahwa kitosan *Penaeus monodon* memiliki daya hambat biofilm. Pada uji Post Hoc LSD didapatkan hasil perbedaan bermakna antara konsentrasi 0,2% sampai 1% terhadap kontrol negatif ($p < 0,05$). Pada biofilm *T. denticola* didapatkan densitas terkecil juga pada pada konsentrasi 1% dengan nilai *optical density* sebesar $1,41 \pm 0,405$ yang jauh lebih rendah dibandingkan kontrol negatif (OD $1,96 \pm 0,076$). Kitosan *Penaeus monodon* dapat dikatakan memiliki daya hambat terhadap pembentukan biofilm *T. denticola*. Pada uji Post Hoc LSD terlihat bahwa pada konsentrasi kitosan 0,2% dan 0,6% terdapat perbedaan bermakna dengan kontrol negatif ($p < 0,05$).

Penelitian oleh Costa et al¹⁵ melaporkan bahwa kitosan *Sigma-Aldrich* dapat menghambat perlekatan biofilm periodontal dengan *system dual species biofilm* yang terdiri dari *S. mutans* dengan *P. gingivalis* dan *S. mutans* dengan *P. intermedia* yang sejalan dengan penelitian ini. Hasil penelitian Wedarti et al¹⁶ yang menguji kitosan berbahan kepiting rajungan (*Portunus pelagicus*) terhadap biofilm bakteri *P. gingivalis* mendapatkan bahwa konsentrasi kitosan mulai dari 0,25% dan 0,5% memiliki sifat menghambat biofilm. Pada penelitian yang dilakukan oleh Marzuki¹⁷ didapatkan hasil gabungan antara metronidazole berbasis kitosan memiliki efektifitas antibakteri yang lebih baik dibandingkan dengan bahan metronidazole saja.

Kitosan memiliki antibiofilm yaitu menghambat pertumbuhan biofilm dengan cara menghambat produksi *polysaccharide intercellular adhesin-encoded gene locus* yang berperan dalam adhesi awal pembentukan biofilm pada permukaan yang dilindungi.^{14,18,19} Kitosan memiliki kandungan positif pada gugus amino yang dapat berinteraksi dengan mikroba bermuatan negatif yang membuat kebocoran protein dan lapisan intersel mikroorganisme.¹⁴ Pengaplikasian kitosan pada

bidang kesehatan dapat digunakan sebagai desinfektan, bahan pemulihan luka, pemulihan jaringan pada bedah ortopedi, hemodialisis, serta sebagai inhibitor obat-obatan.²⁰ Di Amerika Serikat, kitosan dapat dibeli secara komersial dengan mudah dan menjadi beberapa produk termasuk digunakan untuk mengontrol perdarahan, misalnya *ChitoClear Hemostatic Dressing*.^{21,22} di bidang kedokteran gigi. Diharapkan di masa mendatang, kitosan dapat digunakan sebagai obat kumur yang memiliki potensi antibakteri yang baik.

SIMPULAN

Kitosan *Penaeus monodon* memiliki efek antibiofilm terhadap *A. actinomycetemcomitans* mulai pada konsentrasi 0,2% hingga 1% dan *Treponema denticola* pada konsentrasi 0,2% dan 0,6%. Penelitian lanjut dibutuhkan untuk mengonfirmasi hasil ini dengan menggunakan bakteri patogen rongga mulut lainnya sehingga kitosan dapat dimanfaatkan sebagai bahan alternatif pengobatan di bidang kedokteran gigi.

Konflik Kepentingan

Penulis menyatakan tidak terdapat konflik kepentingan dalam studi ini.

Ucapan terima

Ucapan terima kasih disampaikan kepada semua yang terlibat dalam penelitian ini terutama Mario Richi, S.Si dan Aradhea Monica Drestia, S.Si sebagai laboran MiCORE Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti, Jakarta, sehingga hasil penelitian ini dapat dituangkan dalam bentuk artikel ilmiah.

DAFTAR PUSTAKA

- Muxika A, Etxabide A, Uranga J, Guerrero P, de la Caba K. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. Int J Biol Macromol [Internet]. 2017;105(Pt 2):1358-68. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.087>
- Badan Pusat Statistik Kabupaten Kendal [Internet]. Kendalkab.bps.go.id. 2022 [cited 2022 Feb 9]. Available from: <https://kendalkab.bps.go.id/indicator/56/493/1/produksi-dan-nilai-produksi-udang->

- windu.html
3. Soebjaktjo S. KKP | Kementerian Kelautan dan Perikanan [Internet]. Kkp.go.id. 2022 [cited 2022 April 17]. Available from: <https://kkp.go.id/djpb/artikel/16870-menteri-edhy-kembangkan-udang-lokal-jerebung-p-merguensis>
 4. Setha B, Rumata F, Silaban Bbr. Karakteristik kitosan dari kulit udang vaname dengan menggunakan suhu dan waktu yang berbeda dalam proses deasetilasi. J Pengolah Has Perikan Indones. 2019; 22(3):498-507.
 5. Verlee A, Mincke S, Stevens CV. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. Carbohydr Polym [Internet]. 2017;164: 268-83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.001>
 6. Kmiec M, Pighinelli L, Tedesco MF, Silva MM, Reis V. Chitosan-properties and applications in dentistry. Adv Tissue Eng Regen Med Open Access. 2017;2(4):205-11. Doi: 10.15406/atroa.2017.02.00035
 7. Ziebolz D, Söder F, Felix J, Kottmann T, Rinke S, Leonie C, et al. Prevalence of periodontal pathogenic bacteria at different oral sites of patients with tongue piercing — results of a cross sectional study. Diagn Microbiol Infect Dis [Internet]. 2019;95(4):114888. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.114888>
 8. Valm AM. The structure of dental plaque microbial communities in the transition from health to dental caries and periodontal disease. J Mol Biol [Internet]. 2019; 431(16):2957-69. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.05.016>
 9. Pitones-Rubio V, Chávez-Cortez EG, Hurtado-Camarena A, González-Rascón A, Serafín-Higuera N. Is periodontal disease a risk factor for severe COVID-19 illness? Med Hypotheses [Internet]. 2020;144 (May):109969. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109969>
 10. Leszczy A, Buczko P, Buczko W, Pietruska M. Periodontal pharmacotherapy – an updated review. Adv Med Sci. 2011;56(2): 123-31. Doi: 10.2478/v10039-011-0044-9.
 11. Harvey JD. Periodontal Microbiology. Dent Clin NA [Internet]. 2017;61(2):253–69. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cden.2016.11.005>
 12. Popova C, Dosseva-Panova V, Panov V. Microbiology of periodontal diseases. A review. Biotechnol Biotechnol Equip. 2013;27(3):3754-9.
 13. Achmad H, Djais AI, Jannah M, Carmelita AB, Uinarni H, Arifin EM, et al. Antibacterial chitosan of milkfish scales (*Chanos chanos*) on bacteria *prophyromonas gingivalis* & *agregatibacter actinomycetemcomitans*. Syst Rev Pharm. 2020;11(6):836-41
 14. Khan F, Pham DTN, Oloketuyi SF, Manivasagan P, Oh J, Kim YM. Chitosan and their derivatives: Antibiofilm drugs against pathogenic bacteria. Colloids Surfaces B Biointerfaces [Internet]. 2020;185:110627. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110627>
 15. Costa EM, Silva S, Pina C, Tavaría FK, Pintado MM. Evaluation and insights into chitosan antimicrobial activity against anaerobic oral pathogens. Anaerobe [Internet]. 2012;18(3):305–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.04.009>
 16. Wedarti YR, Loekito LI, Pangabdian F, Andriani D. Potensi kitosan kepitng rajungan (*Portunus pelagicus*) dalam penghambatan pembentukan biofilm *Porphyromonas gingivalis* dan pertumbuhan *Candida albicans*. Padjadjaran Journal of Dental Researchers and Students. 2020; 4(2):121-7
 17. Marzuki NA. Efektifitas metronidazol berbasis kitosan terhadap daya hambat bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* secara in vitro [Tesis]. Medan: Universitas Sumatera Utara; 2016.
 18. Benhabiles MS, Salah R, Lounici H, Drouiche N, Goosen MFA, Mameri N. Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. Food Hydrocoll [Internet]. 2012; 29(1):48-56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.02.013>
 19. Jeon SJ, Oh M, Yeo WS, Galvão KN, Jeong KC. Underlying mechanism of antimicrobial activity of chitosan microparticles and implications for the treatment of infectious diseases. PLoS One. 2014;9(3):e92723.
 20. Atay HY. Antibacterial activity of chitosan-

- based systems. In: Jana S, editor. *Functional Chitosan*. Singapore: Springer Nature; 2019;45
21. Kumar G, Chaudhary K, Mogha N, Kant A, Masram D. Extended release of metronidazole drug using chitosan/graphene oxide bionanocomposite beads as the drug carrier. *ACS Omega*. 2021; 6(31):20433-44.
22. Waibel K, Haney B, Moore M, Whisman B, Gomez R. Safety of chitosan bandages in shellfish allergic patients. *Military Medicine*. 2011;176(10):1153-6.