

Daya Antibakteri Kombinasi Kitosan Cangkang Udang Putih (*Litopenaeus vannamei*) dan Siprofloksasin terhadap *Salmonella typhi*

(Antibacterial Activity of Combination of White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Shells Chitosan and Ciprofloxacin against *Salmonella typhi*)

Sarah Marsa Tamimi, Dini Agustina, Cicih Komariah
Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121
Email: dini_agustina@unej.ac.id

Abstract

Typhoid fever is an acute infectious disease in the intestinal tract caused by Salmonella typhi. The prevalence of typhoid fever in Indonesia in 2013 was 81% per 100,000 population. Ciprofloxacin is a large-spectrum antibiotics, but in some countries ciprofloxacin has been known to be resistant to S. typhi. Therefore, other methods are needed to improve the effectiveness of ciprofloxacin by combining with chitosan. Chitosan is a polysaccharide which known to be effective in some positive and negative Gram bacteria and able to overcome the resistance of some antibiotics. The research objective was to determine the effect of antibacterial and Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the combination of Litopenaeus vannamei chitosan and ciprofloxacin against S. typhi. The method used to obtain the value of the MIC was microdilution method with quasy-experimental research design and posttest only control group design. MIC which already been obtained then used to find the Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) using a checkerboard test to interpret the effect of the combination. The MIC combination showed different results in each repetition that chitosan: 15.63 to 62.5 µg/mL and ciprofloxacin from 0.03 to 0.5 µg/mL and known to have a smaller value than the MIC single. While the value of FICI from 5 repetitions was 0.476. So, it could be concluded that the combination of chitosan and ciprofloxacin has an antibacterial effect on S. typhi and have a synergistic combination effect.

Keywords: *Salmonella typhi, chitosan, ciprofloxacin, microdilution method, checkerboard test.*

Abstrak

Demam tifoid merupakan penyakit infeksi akut pada saluran pencernaan yang disebabkan oleh *Salmonella typhi*. Prevalensi demam tifoid di Indonesia pada tahun 2013 adalah 81% per 100.000 penduduk. Siprofloksasin merupakan antibiotik berspektrum luas akan tetapi, di beberapa negara siprofloksasin diketahui telah resisten terhadap *S. typhi*. Oleh karena itu, dibutuhkan metode lain untuk meningkatkan efektifitas siprofloksasin dengan mengkombinasikannya dengan kitosan. Kitosan adalah polisakarida yang diketahui efektif pada beberapa bakteri Gram positif dan negatif serta mampu mengatasi resistensi beberapa antibiotik. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui efek antibakteri dan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) kombinasi kitosan *Litopenaeus vannamei* dan siprofloksasin terhadap *S. typhi*. Metode yang digunakan untuk mendapatkan nilai KHM adalah metode mikrodilusi dengan eksperimental semu dan *posttest only control group design*. KHM yang telah didapat kemudian digunakan untuk mencari Konsentrasi Hambat Fraksional Indeks (KHFI) menggunakan tes *checkerboard* untuk menginterpretasi efek kombinasi. KHM kombinasi menunjukkan hasil yang berbeda di tiap pengulangan yaitu kitosan: 15,63 – 62,5 µg/mL dan siprofloksasin: 0,03 – 0,5 µg/mL dan diketahui memiliki nilai yang lebih kecil dibanding KHM tunggal. Sedangkan nilai KHFI dari lima pengulangan adalah 0,476. Sehingga dapat disimpulkan bahwa kombinasi kitosan dan siprofloksasin memiliki efek antibakteri pada *S. typhi* dan memiliki efek kombinasi yang sinergis.

Kata Kunci: *Salmonella typhi, kitosan, siprofloksasin, metode mikrodilusi, tes checkerboard.*

Pendahuluan

Salmonella typhi (*S. typhi*) adalah bakteri Gram negatif, berflagel dan berbentuk batang penyebab demam tifoid [1]. Demam tifoid di Indonesia menempati urutan ke-3 dari 10 penyakit infeksi terbanyak pada tahun 2010 [2]. Pada tahun 2013, angka kejadian demam tifoid mencapai 81% per 100.000 penduduk [3].

Drug of choice demam tifoid di Indonesia adalah kloramfenikol dan lini kedua adalah siprofloksasin [4]. Siprofloksasin merupakan antibiotik berspektrum luas yang mampu menghambat DNA girase dan topoisomerase IV sehingga efektif mengobati berbagai macam penyakit menular yang disebabkan oleh Gram negatif ataupun positif akan tetapi, di beberapa negara siprofloksasin diketahui telah mengalami resistensi terhadap *S. typhi* [5-7]. Oleh karena itu, dibutuhkan metode lain untuk meningkatkan efektifitas siprofloksasin dengan mengkombinasikannya dengan antimikroba alternatif yang potensial seperti kitosan.

Kitosan adalah polisakarida yang diketahui memiliki sifat antibakterial, antifungal, antiviral dan jika dikombinasi dengan antibiotik mampu meningkatkan efektifitas bahkan mengatasi resistensi beberapa antibiotik [8]. Kitosan didapat dari ekstraksi kitin dan kitin merupakan kandungan yang bisa diperoleh dari limbah cangkang udang atau crustacea lainnya [9-10]. Sumber alam di Indonesia yang memiliki persentase kandungan kitosan cukup potensial adalah cangkang udang putih *Litopenaeus vannamei* (*L. vannamei*). Hal ini dikarenakan udang putih merupakan udang dengan jumlah produksi terbanyak selama lima tahun terakhir sampai pada tahun 2014 [11].

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek antibakteri dan konsentrasi minimal kitosan cangkang udang putih (*L. vannamei*) dalam kombinasinya dengan siprofloksasin terhadap *S. typhi* secara *in vitro*.

Metode Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Dasar Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember untuk ekstraksi kitosan dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember untuk melakukan pengamatan kombinasi kitosan dan siprofloksasin terhadap *S. typhi*. Lama waktu yang dibutuhkan adalah satu bulan.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode mikrodilusi dengan

menggunakan media *Mueller-Hinton Broth* (MHB). Jenis dan rancangan dalam penelitian adalah eksperimen semu dan posttest only control group design dengan 4 kelompok kontrol dan 2 kelompok perlakuan. Sampel yang dipakai adalah bakteri *S. typhi* yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember yang disesuaikan dengan standar 0,5 McFarland. Ukuran besar sampel dihitung dengan menggunakan rumus Federer, dan didapat bahwa pengulangan dilakukan minimal 4 kali.

Variabel bebas dalam penelitian adalah konsentrasi kitosan cangkang udang putih (*L. vannamei*) dalam kombinasi dengan 6 tingkatan konsentrasi, yaitu 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,8; dan 3,9 µg/mL. Sedangkan variabel terikat adalah nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) kitosan dalam kombinasinya dengan siprofloksasin yang mampu menghambat pertumbuhan *S. typhi*. Variabel terkontrol adalah sterilisasi alat dan bahan; suspensi bakteri *S. typhi*; media MHB; suhu inkubasi yaitu 37 °C dan lama inkubasi yaitu 18-24 jam.

Prosedur penelitian yang pertama dilakukan adalah ekstraksi kitosan dari cangkang udang putih (*L. vannamei*) yang terdiri dari dua tahap yaitu proses pembentukan kitin dan kitosan. Pada proses pembuatan kitin, dibutuhkan 3 kg udang dengan 15,79 cangkang udang putih yang telah dikeringkan. Cangkang udang putih tersebut kemudian dilakukan proses deproteinasi yaitu perendaman cangkang dalam NaOH 8% selama 60 menit dan demineralisasi yaitu perendaman dalam HCl 1M selama 2 jam. Proses selanjutnya, yaitu proses pembentukan kitosan yaitu proses deasetilasi dengan cara kitin dalam bentuk lembaran yang telah didapat sebelumnya direndam dalam NaOH 50% selama 1 jam. Setelah itu, dilakukan pengeringan dalam oven selama 24 jam pada suhu 100 °C lalu dihancurkan dan dilakukan pengayakan. Bubuk kitosan yang dihasilkan dari proses tersebut berwarna putih kekuningan sebanyak 1,3 gram.

Proses selanjutnya yaitu tahap perlakuan menggunakan metode mikrodilusi untuk melihat KHM kombinasi kitosan dan siprofloksasin. Pertama yang dilakukan adalah menyiapkan microtiter plate 96 well yang telah terisi MHB dan siprofloksasin dengan 10 tingkat konsentrasi menggunakan teknik dilusi bertingkat, yaitu 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,06; dan 0,03 µg/mL. Selanjutnya memasukkan kitosan konsentrasi tertinggi yaitu 125 µg/mL pada baris pertama kemudian dilakukan dilusi

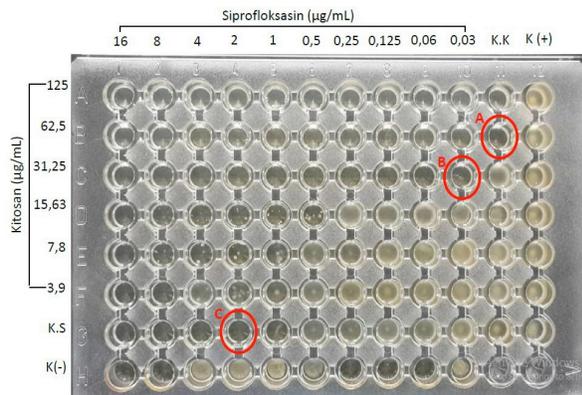
bertingkat sepanjang sumbu Y sampai dengan konsentrasi terendah mencapai 3,9 µg/mL. Kemudian bakteri *S. typhi* diinokulasikan ke dalam plate dengan menyisakan 1 baris sebagai kontrol negatif. Pengamatan KHM ditentukan dengan pengamatan pada konsentrasi berapakah larutan pada sumuran mulai jernih dan tidak ada endapan yang menandakan pertumbuhan *S. typhi* terhambat.

Data KHM yang didapat dari pengulangan kemudian dapat dilakukan penghitungan Konsentrasi Hambat Fraksional (KHF) menggunakan tes *checkerboard* untuk menginterpretasi efek kombinasi. Interpretasi efek kombinasi dilakukan untuk mengetahui bagaimana interaksi kombinasi kitosan dan siprofloksasin tersebut. Sinergis bila KHF ≤ 5 , *additive* $>0,5$ dan ≤ 1 , *indifferent* >1 dan ≤ 2 dan antagonis jika >2 . Rumus dari tes *checkerboard* adalah:

$$\begin{aligned} \text{KHF} &= \text{KHF}_A + \text{KHF}_B \\ &= \frac{\text{KHM}_{\text{Kombinasi A}}}{\text{KHM}_A} + \frac{\text{KHM}_{\text{Kombinasi B}}}{\text{KHM}_B} \end{aligned}$$

Hasil Penelitian

Setelah dilakukan prosedur penelitian dan pengamatan dari kombinasi kitosan dan siprofloksasin terhadap pertumbuhan bakteri *S. typhi*, diperoleh data yang disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil pengamatan KHM
 A : KHM kitosan tunggal 62,5 µg/mL
 B : KHM kombinasi, kitosan: 31,25 µg/mL dan siprofloksasin 0,03 µg/mL
 C : KHM siprofloksasin tunggal 8 µg/mL

Gambar 1 menunjukkan hasil pengamatan KHM kombinasi maupun tunggal dari kitosan dan siprofloksasin. KHM kitosan kombinasi dan tunggal adalah 31,25 dan 62,5 µg/mL.

Sedangkan KHM siprofloksasin kombinasi dan tunggal adalah 0,03 dan 8 µg/mL. Kemudian dilakukan pengulangan sebanyak 5 kali dan data KHM yang didapat dilakukan penghitungan KHF dengan tes *checkerboard* yang disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil pengukuran KHF dengan tes *checkerboard*

Kel.	KHM _k	KHM _{kk}	KHF _k	KHM _s	KHM _{ks}	KHF _s	KHF	Efek
P1	62,5	31,25	0,5	8	0,03	0,004	0,504	Additive
P2	125	62,5	0,5	8	0,03	0,004	0,504	Additive
P3	31,25	15,63	0,5	8	0,5	0,062	0,562	Additive
P4	62,5	15,63	0,25	8	0,25	0,031	0,281	Sinergis
P5	62,5	31,25	0,5	8	0,25	0,031	0,531	Additive
Rata-rata							0,476	Sinergis

KHM_k : KHM kitosan tunggal
 KHM_{kk} : KHM kombinasi kitosan
 KHF_k : KHF kitosan
 KHM_s : KHM siprofloksasin tunggal
 KHM_{ks} : KHM kombinasi siprofloksasin
 KHF_s : KHF siprofloksasin
 P : Pengulangan

Berdasar Tabel 1, efek yang ditunjukkan dari kombinasi adalah sinergis dengan nilai KHF 5 pengulangan adalah 0,476. Selain itu, KHM yang ditunjukkan saat kombinasi memiliki nilai yang lebih kecil dibanding KHM ketika dipakai tunggal.

Pembahasan

Pada penelitian ini didapatkan hasil bahwa kombinasi kitosan (*L. vannamei*) dan siprofloksasin memiliki efek antibakteri terhadap *S. typhi*. Hal ini dibuktikan dengan terbentuknya larutan yang jernih tanpa endapan pada sumuran dalam *plate* yang menunjukkan pertumbuhan *S. typhi* terhambat.

Pada kelompok perlakuan P1 – P5 (lihat Tabel 1), dapat diketahui bahwa KHM kombinasi baik kitosan dan maupun siprofloksasin memiliki nilai yang lebih rendah dibanding KHM tunggalnya. Hal ini memiliki makna bahwa kombinasi kitosan dan siprofloksasin memiliki efek mampu menurunkan KHM tunggal masing-masing antibakteri.

Data KHM yang telah didapat, diinterpretasikan menggunakan tes *checkerboard* dan didapatkan nilai KHF dari 5 pengulangan adalah 0,476, yang artinya kombinasi antibakteri memiliki efek sinergis. Efek sinergis adalah efek yang dihasilkan kombinasi lebih baik secara signifikan daripada

penjumlahan kedua efek antibakteri tersebut [12]. Hal ini dikarenakan kitosan dan siprofloksasin dalam kombinasinya saling mendukung dalam mengakibatkan kerusakan bakteri meskipun kedua antibakteri tersebut memiliki target kerja yang berbeda.

Kitosan memiliki target kerja pada dinding dan membran sel. Hal ini dikarenakan, kitosan yang larut dalam asam asetat memiliki ion bebas positif sedangkan dinding sel bakteri Gram negatif memiliki hidrofilitas tinggi yang artinya lapisan hidrofilik pada dinding sel bakteri *S. typhii* memiliki muatan negatif dan dapat berikatan dengan kitosan [13]. Selain itu, kitosan diketahui mampu berikatan dengan lemak. Sehingga oleh karena inilah kitosan diketahui mampu mengganggu fungsi membran dikarenakan kitosan dapat berikatan dengan lipid pada membran [14]. Ikatan yang terjadi antara kitosan dengan membran dan dinding sel bakteri mengakibatkan terganggunya fungsi transport elektron serta terjadi kebocoran komponen sel [12, 14]. Hal inilah yang mengakibatkan *uptake* siprofloksasin ke dalam *S. typhii* meningkat. Sehingga, kerja siprofloksasin sebagai inhibitor sintesis DNA yang memiliki target kerja pada DNA girase, akan semakin meningkatkan inhibisinya pada sintesis DNA bakteri dan tidak terbentuknya sel-sel bakteri yang baru [12].

Penjelasan tersebut menjelaskan mengenai bagaimana mekanisme kitosan mampu mendukung kerja antibiotik untuk menghambat pertumbuhan bakteri akan tetapi tidak ada penjelasan pada penelitian sebelumnya bagaimana antibiotik mendukung kerja kitosan untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Hal ini dapat dilihat pada Tabel 1 bahwa KHM siprofloksasin pada kombinasi di beberapa perlakuan jauh lebih kecil sampai $\frac{1}{256}$ kalinya dari KHM tunggal. Akan tetapi berbeda dengan kitosan, KHM kitosan kombinasi memiliki rentang KHM $\frac{1}{2}$ sampai $\frac{1}{4}$ kalinya dari KHM tunggal (lihat Tabel 1, pada P1, P2, P3 dan P5), sehingga karena hal inilah dalam penelitian ini maupun penelitian sebelumnya menghasilkan efek interaksi antar antibakteri yang *additive*.

Additive adalah efek kombinasi yang dihasilkan sama dengan penjumlahan efek masing-masing antibakteri saat digunakan tunggal [15]. Mekanisme yang terjadi sehingga timbulkan efek *additive* dikarenakan kitosan pada kombinasi mampu berikatan dengan dinding sel bakteri sehingga hal ini menyebabkan terganggunya fungsi dinding dan

mengakibatkan kebocoran komponen sel tanpa membentuk pori yang jelas. Akan tetapi, kitosan ini tidak akan mampu mencapai sitoplasma dan merusak organel-organel didalamnya. Hal ini dikarenakan dalam penelitian sebelumnya menjelaskan bahwa kitosan tidak mampu menembus pertahanan dari membran sel pada beberapa bakteri. Pada penelitian tersebut menjelaskan bahwa membran sel bakteri *S. simulans* yang telah terpapar oleh kitosan selama 60 menit terlepas ikatannya dengan dinding sel sehingga menghasilkan bentuk vakuola. Akan tetapi, tidak terlihat kerusakan yang nyata pada membran selnya [13].

Simpulan dan Saran

Kombinasi kitosan cangkang udang putih (*L. vannamei*) dan siprofloksasin dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* serta menunjukkan KHM kombinasi yang lebih kecil dibanding KHM tunggal. Selain itu, kombinasi kitosan cangkang udang putih (*L. vannamei*) dan siprofloksasin terhadap bakteri *S. typhi* memiliki efek sinergis dengan nilai KHFI yaitu 0,476.

Perlu dilakukan uji daya antibakteri kombinasi kitosan dengan antibiotik dan isolat bakteri yang tingkat resistensinya mulai meningkat lebih dari satu agar dapat diukur secara statistik dan dapat dilihat bagaimana efek antar kombinasi tersebut. Selain itu, penelitian mengenai uji daya antibakteri kombinasi kitosan dengan berat molekul, tingkat deasetilasi dan derivat yang berbeda dengan siprofloksasin terhadap bakteri *S. typhi* serta dosis terapi, toksisitas, dan reaksi alergi yang ditimbulkan oleh kombinasi kitosan cangkang udang putih (*L. vannamei*) perlu dilakukan.

Daftar Pustaka

- [1] Syarurachman A, Chatim A, Soebandrio A, Kurniawati A, Santoso AUS. Buku ajar mikrobiologi kedokteran edisi revisi. Jakarta: Binarupa Aksara Publisher; 2010.
- [2] Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Profil kesehatan Indonesia. Jakarta: Kementerian Kesehatan Indonesia; 2011.
- [3] Miranti A. Gambaran penderita rawat inap demam tifoid di Rumah Sakit Umum Pusat Hasan Sadikin Bandung periode 1 Januari 2012- 31 Desember 2012. Bandung:

- Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Maranatha; 2014.
- [4] Nelwan RHH. Tata laksana terkini demam tifoid. CDK-192. 2012; 39(4): 247-250.
- [5] Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Farmakologi Dasar dan Klinik. Edisi Keduabelas. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC; 2015
- [6] Goodman LS, Gilman A. The pharmacological basis of therapeutics. 12th Ed. USA: The McGraw-Hill Companies Inc; 2011.
- [7] Mulyana Y. Sensitivitas *Salmonella. sp* penyebab demam tifoid terhadap beberapa antibiotik di Rumah Sakit Immanuel Bandung. Jurnal Kesehatan.
- [8] Mu H, Guo F, Niu H, Liu Q, Wang S, Duan J. Chitosan improves anti-biofilm efficacy of gentamicin through facilitating antibiotic penetration. Int J Mol Sci. 2014; 15: 22296 – 22308.
- [9] Bansal V, Sharma PK, Sharma N, Pal OP, Malviya R. Application of chitosan and chitosan derivatives in drug delivery. Advan Biol Res. 2011; 5(1): 28-37.
- [10] Kurniasih, M, Kartika D. Sintesis dan karakterisasi fisika-kimia kitosan. Jurnal Inovasi. 2011; 5(1): 42 – 48.
- [11] Indonesia. Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya. Arsip Statistik. Jakarta: DJPB; 2015.
- [12] Satria AD. Daya antibakteri kombinasi chitosan - gentamisin terhadap *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* secara in vitro. Yogyakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada; 2013.
- [13] Chung YC, Su YP, Chen CC, Jia G, Wang HL, Wu JCG, Lin JG. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristic of cell wall. Acta Pharmacol Sin. 2004; 25(7): 932-936.
- [14] Raafat D, Bargaen KV, Haas A, Sahl HG. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. Appl Environ Microbiol. 2008; 74(12): 3764-3773.
- [15] Meletiadis J, Pournaras A, Roilides E, Walsh TJ. Defining fractional inhibitory concentration index cutoffs for additive interactions based on self-drug additive combinations, monte carlo simulation analysis, and *in vitro-in vivo* correlation data for antifungal drug combinations against *Aspergillus fumigatus*. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(2): 602-609.