

Aktivitas Antifungal Kitosan Rajungan dan Udang terhadap *Candida albicans*

Komariah,*Latifah

Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Trisakti

Abstrak

Kitosan merupakan hasil deasetilasi kitin dan banyak ditemukan pada cangkang hewan avertebrata laut berkulit keras (Crustacea). Kitosan merupakan suatu amina polisakarida yang berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri dan jamur, termasuk *Candida albicans*. Pada penelitian ini digunakan kitosan rajungan (*Portunus pelagicus*) dengan derajat deasetilasi (DD) 89% dan kitosan udang (*Penadeus monodon*) dengan derajat deasetilasi (DD) 93%. Tujuan penelitian ini untuk menguji daya hambat kitosan tersebut terhadap pertumbuhan *C. albicans*. *Candida albicans* termasuk flora normal di dalam rongga mulut dan bersifat saprofit namun dapat menjadi patogen bila terdapat faktor predisposisi pada tubuh pejamu. Efek antifungal yang dihasilkan kitosan DD 89% dan kitosan DD 93% terhadap pertumbuhan *C. albicans* diuji dengan metode difusi cakram. Konsentrasi kitosan yang dipakai pada uji adalah 0,25%, 0,5%, 0,75%, 1%, dan 1,25% (b/v). Zona hambat yang terbentuk pada masing-masing kelompok konsentrasi berbeda. Diameter zona hambat terbesar yaitu 8 mm dan terdapat pada konsentrasi kitosan udang 1,25%. Sedangkan diameter zona hambat terkecil yaitu 4 mm terdapat pada konsentrasi kitosan rajungan 0,25%.

Kata kunci: Kitosan, *Candida albicans*, derajat deasetilasi, zona hambat

Antifungal Activity of Chitosan Extracted from *Crab* and *Shrimp* to *Candida albicans*

Abstract

Chitosan can be formed from deacetylation of chitin from marine invertebrate shells (Crustacea). It is amino polysaccharide and it has antibacterial and antifungal activity. In this study, we used chitosan from *Portunus pelagicus* (89% deacetylation degree) and *Penadeus monodon* (93% deacetylation degree). The aim of this study is measure of inhibition *Candida albicans* with chitosan, because that bacteria is normal flora in the mouth and saprophytic. However, it can become pathogenic if there is a predisposing factor in the host. We used diffusion disc method in this study with several concentrations of chitosan (0,25%, 0,5%, 0,75%, 1%, 1,25% w/v). The results showed, the chitosan has antifungal activity. The highest antifungal activity was showed in 1,25% *P. monodon* chitosan with 8 mm of inhibition zone. The lowest antifungal activity was showed in 0,25% *P. pelagicus* chitosan with 4 mm inhibition zone.

Keywords: chitosan, *Candida albicans*, deacetylation degree, inhibition zone

*K: Penulis Koresponden; E-mail: akomariah67@gmail.com

Pendahuluan

Candida merupakan komensal dalam tubuh manusia, namun dalam kondisi tertentu dapat berubah menjadi patogen.^{1,2} Dalam bentuk patogen, *Candida* dapat mengakibatkan infeksi imperforialis maupun sistemik. Penyebab utama infeksi *Candida* adalah *Candida albicans*. Pengobatan infeksi *Candida*/ kandidosis biasanya menggunakan obat derivat azol. Beberapa penelitian tentang penggunaan obat alternatif yang berasal dari alam telah dilakukan. Bahan tersebut antara lain kitosan yang bersal dari cangkang Crustacea.

Perairan Indonesia merupakan sumber cangkang hewan avertebrata laut berkulit keras (Crustacea) pengandung kitin yang berlimpah. Bergantung pada spesies, kadar kitin yang terkandung dalam Crustacea berkisar antara 20-60%. Saat ini di Indonesia, limbah yang dihasilkan dari cangkang tersebut sekitar 56200 ton pertahun.³

Sifat kitin yang tidak beracun dan mudah terdegradasi mendorong dilakukannya modifikasi dengan tujuan mengoptimalkan kegunaan maupun memperluas aplikasinya. Salah satu senyawa turunan kitin yang banyak dikembangkan karena aplikasinya yang luas adalah kitosan. Kitosan merupakan amina polisakarida hasil proses deasetilasi kitin. Senyawa tersebut merupakan biopolimer alam penting, bersifat poli-kationik sehingga dapat diaplikasikan dalam berbagai bidang, misalnya sebagai agen antimikrobial. Ekstraksi limbah cangkang hewan menjadi kitin dan kitosan dilakukan melalui proses deproteinasi, demineralisasi, dekolorasi dan deasetilasi.⁴ Proses deasetilasi akan mengubah gugus asetamida menjadi gugus amina. Perubahan gugus dalam suasana basa kuat merupakan proses deasetilasi kitin menjadi kitosan dan menghasilkan kitosan dengan derajat deasetilasi dan massa molekul yang bervariasi. Kitosan mempunyai peran multifungsi dengan skala

luas karena sifatnya yang ramah lingkungan, biokompatibel mudah mengalami degradasi, tidak beracun, serta sifat fisik dan kimia yang baik, sehingga senyawa ini dapat direkomendasikan penggunaannya dalam industri ramah lingkungan. Pengaplikasian kitin dan kitosan di berbagai bidang sangat ditentukan oleh mutunya yang sangat bergantung pada derajat deasetilasi.⁵

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efikasi kitosan dalam menghambat pertumbuhan *C. albicans*. Sifatnya yang ramah lingkungan, tidak beracun, serta sifat biologi, kimia dan kationik yang baik, memungkinkan penggunaannya sebagai agen anti jamur.

Bahan dan Cara

Bahan

Bahan baku yang digunakan; Natrium Hidroksida (Merck) digunakan untuk proses deproteinisasi dan deasetilasi, asam klorida (Merck) digunakan untuk proses demineralisasi, asam asetat (Merck) digunakan untuk melarutkan kitosan, H₂O₂ digunakan dalam proses dekolorisasi, pH universal, *Candida albicans* (Departemen Mikrobiologi FKUI), agar sabouraud dekstroza, *aqua bidestillata*, *aquades*, alkohol, nistatin (obat antijamur), NaCl 8,5%.

Pembuatan Kitosan^{5,6,7}

Pembuatan Kitosan Melalui Beberapa Proses diantaranya:

1. Penghilangan mineral (demineralisasi)
Demineralisasi dilakukan dengan larutan HCl 4% pada kondisi suhu 90°C selama 1 jam. Proses demineralisasi dilakukan untuk penghilangan mineral.
2. Penghilangan protein (deproteinasi)
Deproteinasi kitin merupakan reaksi

hidrolisis dalam suasana asam atau basa. Lazimnya hidrolisis dilakukan dalam suasana basa dengan menggunakan larutan NaOH 4 N pada suhu 90°C selama 1 jam. Pada tahap deproteinasi, protein diubah menjadi garam natrium proteinat yang larut dalam air.

3. Penghilangan warna (dekolorasi)

Zat warna yang terkandung dalam cangkang hewan crustacea (udang) dapat dihilangkan dengan merendam dalam larutan pemucat (NaHClO) atau H₂O₂ 3%, selama 10 menit.

4. Penghilangan gugus asetat (deasetilasi)

Deasetilasi secara kimiawi dapat dilakukan dengan menggunakan basa kuat NaOH 50%. Penggunaan KOH, akan memutus ikatan hidrogen yang kuat antara rantai kitin. Pada proses deasetilasi, degradasi oksidatif harus dicegah agar bobot molekul kitosan yang diperoleh tinggi.

5. Karakterisasi Kitosan

Karakterisasi kitosan dilakukan untuk melihat gugus fungsional kitosan dengan menggunakan spektrofotometer *fourier transform infra red* (FTIR). Hasil analisis FTIR menunjukkan kitosan yang dihasilkan memiliki derajat deasetilasi (DD) 89% dan DD 93%. Kadar derajat deasetilasi 89% memiliki arti bahwa gugus asetil dalam kitin telah terasetilasi sebanyak 89%, begitu pula dengan DD 93%.

Pengenceran Kitosan Udang dan Rajungan

Sebelum bekerja, area kerja dibersihkan dengan alkohol 70%. Untuk mendapatkan konsentrasi kitosan 0,25%, serbuk kitosan udang dan rajungan ditimbang masing-masing sebanyak 0,25 gram. Setelah ditimbang masing-masing serbuk dimasukkan ke dalam botol kaca steril. Selanjutnya ditambahkan 25 mL asam asetat 1 N dan 75 mL aquades. Larutan tersebut

digoyang-goyangkan agar tercampur rata. Langkah yang sama dilakukan untuk mendapatkan konsentrasi 0,5%, 0,75%, 1%, dan 1,25% dengan serbuk kitosan seberat 0,5 gram, 0,75 gram, 1 gram dan 1,25 gram. Kitosan DD 93% sebanyak 20 µl kitosan dengan konsentrasi berbeda, masing-masing diteteskan pada kertas cakram steril, dan dibiarkan meresap dan mengering. Untuk kontrol positif digunakan kertas cakram yang telah berisi nistatin, Untuk kontrol negatif digunakan cakram yang berisi asam asetat yang merupakan pelarut kitosan.

Candida albicans

Sebelum digunakan *C. albicans* disegarkan pada media agar sabouraud deskrosa (ASD) selama 24 jam dalam inkubator sehingga didapatkan fase log. Selanjutnya dibuat suspensi dengan konsentrasi 1 McFarland.

Sebanyak 100 µl suspensi *C. albicans* tersebut ditanam pada ASD. Kertas cakram yang telah mengandung masing-masing konsentrasi kitosan diletakkan di atas media yang telah di tanami jamur. Langkah yang sama dilakukan untuk kitosan DD 89%.

Penelitian dilakukan dengan pengulangan tiga kali (triplo) baik untuk kitosan DD 93% maupun kitosan DD 89%. (Gambar 10). Selanjutnya semua media baik perlakuan maupun kontrol diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Pengaruh kitosan terhadap pertumbuhan *C. albicans* dilihat dari zona hambat (ZH) yang terbentuk. Setelah 48 jam pembacaan diameter ZH dilakukan dengan jangka sorong.

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan uji normalitas, uji Anova 2 jalan dan uji Tukey. Untuk membandingkan dengan kontrol digunakan metode analisis uji Anova 1 jalan dan uji Tukey HSD.

Hasil

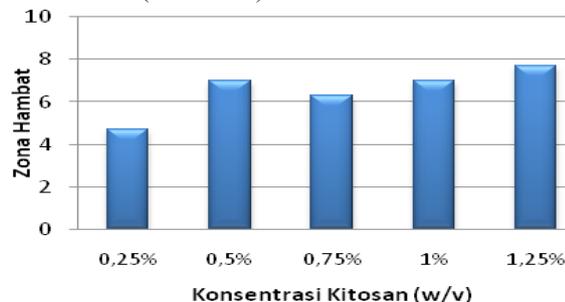
Penilaian kemampuan kitosan untuk menghambat pertumbuhan jamur dilihat dari zona hambat yang terbentuk. Zona hambat pertumbuhan *C. albicans* terbentuk bila pada kitosan DD 93%, maupun kitosan DD 89% dengan konsentrasi 0,25%, 0,5%, 0,75%, 1%, 1,25%

Pada Tabel 1 diperlihatkan hasil pengukuran diameter zona hambat kitosan DD 89% terhadap *C. albicans* didapatkan rata-rata \pm simpang baku pada konsentrasi 0,25% yaitu $4,7 \pm 5,33$ mm. Pada konsentrasi 0,5% didapat rata-rata $7,0 \pm 5,67$ mm. Pada konsentrasi 0,75% didapat rata-rata yaitu $6,3 \pm 6,33$ mm. Sedangkan pada konsentrasi 1% didapat rata-rata $7,0 \pm 7,033$, dan pada konsentrasi 1,25% didapat rata-rata yaitu $7,7 \pm 6,77$

Tabel 1. Rata-rata (\pm simpang baku) Diameter Zona Hambat Kitosan DD 89% terhadap Pertumbuhan *C. albicans*

Konsentrasi kitosan DD 89%	Rata-rata (mm)	Simpang baku
0,25%	4,7	5,33
0,50%	7,0	5,67
0,75%	6,3	6,33
1%	7,0	7,33
1,25%	7,7	6,67
Kontrol positif	13	-
Kontrol negatif	-	-

Hubungan konsentrasi kitosan dalam menghambat pertumbuhan (zona hambat) *C. albicans* dalam media ASD (Gambar 1).



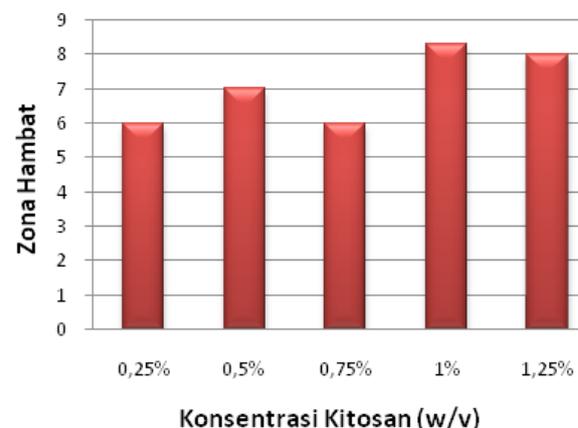
Gambar 1. Pengaruh diameter zona hambat terhadap pertumbuhan *C. albicans* kitosan DD 89%

Pada Tabel 2 terlihat hasil pengukuran diameter zona hambat kitosan DD 93% terhadap *C. albicans*. Didapatkan rata-rata (\pm simpang baku) pada konsentrasi 0,25% yaitu $6,0 \pm 5,33$. Pada konsentrasi 0,5% didapat rata-rata (\pm simpang baku) yaitu $7,0 \pm 5,67$. Pada konsentrasi 0,75% didapat rata-rata (\pm simpang baku) yaitu $6,0 \pm 6,33$. Sedangkan pada konsentrasi 1% didapat rata-rata (\pm simpang baku) yaitu $8,3 \pm 7,33$, dan pada konsentrasi 1,25% didapat rata-rata (\pm simpang baku) yaitu $8,0 \pm 6,67$.

Tabel 2. Rata-rata (\pm Simpang Baku) Diameter Zona Hambat Kitosan DD 93% terhadap Pertumbuhan *C. albicans*

Konsentrasi kitosan DD 93%	Rata-rata (mm)	Simpang baku
0,25%	6,0	5,33
0,50%	7,0	5,67
0,75%	6,0	6,33
1%	8,3	7,33
1,25%	8,0	6,67
Kontrol positif	13	-
Kontrol negatif	-	-

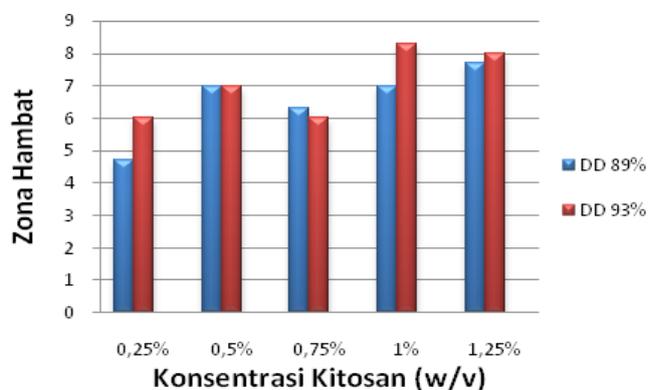
Hubungan konsentrasi kitosan dalam menghambat pertumbuhan *C. albicans* dalam media ASD (Gambar 1). Hasil penelitian memperlihatkan pada masing-masing kelompok konsentrasi memberikan pembentukan zona hambat yang berbeda. Hal ini menandakan aktifitas antifungal kitosan meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi.



Gambar 2. Grafik hubungan bahan yang digunakan dengan diameter zona hambat yang terbentuk pada kitosan DD 93%

Pada kitosan dengan DD 93% terlihat penurunan zona hambat. Pada konsentrasi 1%, ZH yang terbentuk 8,3 mm namun pada konsentrasi 1,25% menjadi 8,0 mm. Hal ini dapat disebabkan semakin tinggi konsentrasi, maka viskositas akan semakin meningkat hingga kitosan akan lebih sulit berdifusi ke dalam agar. Pada kitosan dengan derajat deasetilasi 89% memperlihatkan ZH yang terbentuk antara 4,7 – 7 mm. Zona hambat terkecil ditemukan pada konsentrasi 0,25% yakni sebesar 4,7 mm, sedangkan ZH terbesar pada konsentrasi 1,25%, yaitu 7 mm. Untuk kitosan dengan derajat deasetilasi 93% memperlihatkan zona hambat yang terbentuk antara 6,0 – 8,3 mm. Zona hambat terkecil ditemukan pada kitosan konsentrasi 0,25% yakni sebesar 6,0 mm, sedangkan zona hambat terbesar pada konsentrasi 1% sebesar 8,3 mm.

Hubungan derajat desasetilasi kitosan pada masing-masing kelompok konsentrasi dalam menghambat pertumbuhan *C. albicans* (Gambar 2).



Gambar 3. Grafik perbandingan zona hambat kitosan DD 89% dan kitosan DD 93%

Diskusi

Kitosan yang digunakan pada penelitian ini merupakan hasil deasetilasi kitin yang berasal dari cangkang hewan Crustacea. Pada proses deasetilasi terjadi pelepasan gugus asetil sehingga menghasilkan gugus

amina bebas, banyaknya gugus asetil yang hilang dinyatakan dengan derajat deasetilasi. Pada penelitian ini digunakan dua derajat deasetilasi yang berbeda dalam menghambat pertumbuhan *C. albicans* yaitu 89% dan 93%. Hasil menunjukkan bahwa semakin tinggi derajat deasetilasi semakin besar daya hambat terhadap pertumbuhan *C. albicans* walaupun tidak setiap konsentrasi menunjukkan kenaikan daya hambat secara linier. Hal ini bisa disebabkan dari kelarutan kitosan yang tidak sempurna pada pelarut. Selain itu, peningkatan daya hambat dari kitosan dapat disebabkan terdapatnya kandungan kitinase dan glukonase pada kitosan. Aktivitas dari kedua enzim tersebut dapat menghambat pertumbuhan hifa dikarenakan penurunan jumlah kitin pada dinding hifa.⁸ Oleh karenanya, meningkatnya konsentrasi kitosan, semakin tinggi daya hambat kitosan terhadap *C. albicans*.

Greenwood di dalam Milah *et al.*,⁹ mengklasifikasikan respons hambatan pertumbuhan menjadi empat kategori. Bila diameter zona hambat lebih dari 20 mm maka respons hambatan pertumbuhan tersebut dikategorikan kuat dan bila diameter zona hambat antara 20 mm – 16 mm dikategorikan sedang. Suatu respons hambatan pertumbuhan dikategorikan lemah bila diameter zona hambatnya antara 15 mm – 10 mm dan dikategorikan tidak memiliki respons hambatan pertumbuhan bila diameter zona hambatnya 0. Dari hasil penelitian ini terlihat kemampuan kitosan dalam menghambat pertumbuhan *C. albicans* termasuk dalam kategori lemah.

Selain itu, kitosan dengan derajat deasetilasi yang rendah memiliki BM tinggi (lebih besar dari 500 kDa) memiliki aktivitas antifungal yang kurang efektif dibandingkan kitosan dengan BM yang lebih rendah.¹⁰ Hal ini terkait dengan viskositas kitosan yang besar pada kitosan dengan BM tinggi, sehingga kitosan sulit berdifusi. Pada

kitosan dengan memiliki panjang rantai yang lebih banyak sehingga lebih aktif dalam menghambat pertumbuhan jamur.

Kesimpulan

Kitosan memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan *C. albicans*. Semakin tinggi konsentrasi, meningkatkan daya hambat terhadap *C. albicans*. Namun perlu dilakukan upaya untuk meningkatkan group amina > 93% agar didapat daya hambat yang lebih besar.

Daftar Pustaka

1. Anaisse EJ. The changing epidemiology of *Candida* infection.; 2-6: 10-15. Diunduh URL: http://www.medscape.com/viewprogram/7208_pnt. 31 May 2007
2. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiology an introduction. Ed. ke-8. San Francisco: Benjamin Cummings; 2004; 606-7.
3. Laboratorium Protan. Cationic polymer for recovering valuable by product from processing waste. Burgess. USA. 1989
4. Muzarelli. *In vivo* and *in vitro* biodegradation of oxychitin-chitosan and oxypullulan-chitosan complexes. 2002; 48: 15-21.
5. Rianta P. Manfaat kitin dan kitosan bagi kehidupan manusia. *Oseana* 2014; 39: 35-43
6. Dompeipen ED, Kaimudin M, Dewa RP. Isolasi kitin dan kitosan dari limbah kulit udang. *Majalah Biam* 2016; 12: 32-8
7. Yuliasara F, Sari MN, Choriah MN, Mahmiah. Pembuatan kitin dan kitosan dari kulit udang vaname. *Prosiding Seminar Nasional Kelautan XIV: Implementasi Hasil Riset Sumber Daya Laut dan Pesisir Dalam Peningkatan Daya Saing Indonesia*. Fakultas Teknik dan Ilmu Kelautan Universitas Hang Tuah, Surabaya 11 Juli 2019
8. Rogis A, Pamekas T, Mucharromah. Karakteristik dan uji efikasi bahan senyawa alami chitosan terhadap patogen pasca panen antraknosa *Colletotrichum musae*. *Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian Indonesia* 2007; 9: 58-63
9. Greenwood D. 1995. Antibiotics Susceptibility (Sensitivity) Test, Antimicrobial and Chemotherapy. United State of America: Mc Graw Hill Company. Di dalam Milah N, Bintari SH, Mustikaningtyas D. Pengaruh konsentrasi antibakteri propolis terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* secara *in vitro*. *Life Science* 2016; 5: 95-9
10. Scheinfeld NS. Candidiasis cutaneous. Diunduh dari: URL:<http://www.emedicine.com>. 18 Juni 2018