

Uji Aktivitas Antibakteri dan Antifungi Kitosan dengan Pelarut Asam Askorbat

Angela Evelyn, Lia Amelia Tresna Wulan Sari, Margareth Juanita Aileen Lugito*, Clairry Theodora

Program Studi Teknik Material

Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Kristen Maranatha

Institut Teknologi Bandung, Indonesia

ABSTRAK

Resin akrilik yang banyak digunakan di bidang kedokteran gigi membutuhkan pemeliharaan dan pembersihan yang adekuat. Salah satu cara membersihkannya adalah dengan perendaman dalam larutan pembersih gigi tiruan yang memiliki aktivitas antibakteri dan antifungi. Kitosan merupakan agen antibiotik dan antifungi alami, namun asam asetat yang digunakan sebagai pelarut membuatnya bersifat toksik, oleh karena itu perlu dicari alternatif pelarut. Asam askorbat adalah salah satu asam yang dapat melarutkan kitosan. Penelitian ini bertujuan untuk menguji sifat antibakteri dan antifungi kitosan yang dilarutkan pada pelarut asam askorbat dengan tiga persentase komposisi berbeda sebagai bahan perendam resin akrilik. Penelitian ini terdiri dari dua tahap yaitu pengujian antibakteri dan antifungi. Pengujian dilakukan dengan mengkontaminasikan plat resin akrilik dengan koloni *Streptococcus mutans* dan *Candida albicans*, lalu dilakukan perendaman pada 5 kelompok yang berbeda yaitu kelompok kontrol (akuades), asam askorbat, kitosan 1%, 2%, dan 3%. Uji efektifitas antibakteri dan antifungi dilakukan dengan menggunakan metode difusi (Kirby-bauer). Hasilnya dianalisis secara statistik. Hasil uji aktifitas antibakteri dan antifungi memperlihatkan pengaruh signifikan terbesar perendaman resin akrilik pada larutan kitosan dengan konsentrasi 1% yaitu dengan jumlah koloni terkecil $1,21 \times 10^4$ cfu/ml untuk *Streptococcus mutans* dan 4083 cfu/ml untuk *Candida albicans*. Hal ini disebabkan karena konsentrasi tersebut adalah yang paling efektif dapat melarutkan kitosan.

Kata kunci: Antibakteri, Antifungi, Kitosans

Antibacterial and Antifungal Test of Chitosan solution on Ascorbic Acid Solvent

ABSTRACT

Acrylic resins are widely used as removable denture baseplate. These resins need adequate cleaning and maintenance. One way to clean resin denture is by immersing it in a denture

Korespondensi:

Angela Evelyn

Email: angela.evelyna@dent.maranatha.

cleanser solution. Denture cleanser should have antibacterial and antifungal properties. Chitosan is a natural antibacterial and antifungal substance. Unfortunately, acetic acid used as solvent for chitosan solvent can cause toxicity to cells. Ascorbic acid can be used as an alternative solvent for chitosan with lower toxicity than acetic acid. The aim of this study is to test antibacterial and antifungal activity of chitosan solution in ascorbic acid for the use as resin acrylic cleanser. In this study we evaluate antibacterial and antifungal activity of chitosan solution in ascorbic acid as denture cleanser solution. Acrylic resin plates were contaminated with Streptococcus mutans and Candida albicans colonies and then were immersed in five different groups of solutions, aquadest as control group, ascorbic acid, 1%, 2%, and 3% chitosan solution in ascorbic acid. Antibacterial and antifungal activity test were examined by using diffusion method (Kirby-bauer). The results were analysed using statistical analysis. Antibacterial and antifungal activity test results show that the highest significant influence was observed in 1% chitosan group, showing $1,21 \times 10^4$ cfu/ml for Streptococcus mutans colonies and 4083 cfu/ml for Candida albicans colonies. The optimal percentage volume for adequate antibacterial and antifungal chitosan solution in ascorbic acid is 1%.

Keywords: Antibacterial, Antifungal, Chitosan

LATAR BELAKANG

Kehilangan gigi dapat menyebabkan terganggunya berbagai fungsi sistem stomatognati, oleh karena itu diperlukan pembuatan alat rehabilitatif yaitu protesa gigi. Salah satu jenis protesa gigi yang banyak digunakan karena mudah, cukup terjangkau dan dapat bertahan lama adalah gigi tiruan sebagian lepasan atau yang biasa disebut removable partial denture.^{1,2} Komponen gigi tiruan lepasan yang berkontak langsung dengan jaringan mukosa mulut, khususnya

mukosa linggir alveolar dan mukosa palatum (langit-langit mulut) adalah landasan gigi tiruan. Bahan landasan gigi tiruan sebagian lepasan yang umumnya digunakan adalah resin Poly-methyl-methacrylate (PMMA) atau yang biasa dikenal dengan resin akrilik.³⁻⁵ Resin akrilik seperti layaknya plastik atau jenis resin lainnya memiliki tekstur permukaan berpori dalam skala mikro. Pori inilah yang menyebabkan mudah melekatnya plak dan debris makanan sehingga memicu pertumbuhan jamur seperti Candida albicans dan mikroorganisme patogen rongga mulut seperti Streptococcus mutans.⁶⁻⁸

Mikroorganisme patogen dapat memicu terjadinya denture stomatitis pada pemakai gigi tiruan berbasis resin akrilik. Denture stomatitis dapat dicegah melalui pembersihan landasan gigi tiruan secara benar dan teratur. Salah satu metode pembersihan gigi tiruan yang paling mudah dan umum digunakan adalah melalui perendaman pada bahan rendam pembersih gigi tiruan yang dijual bebas di pasaran atau yang biasa disebut chemical denture cleanser. Bahan kimia perendam gigi tiruan biasanya bersifat antiseptik dan desinfektan, namun bahan ini memiliki kekurangan yaitu kurang biokompatibel dengan jaringan tubuh karena terbuat dari unsur-unsur kimia sintetis dan harganya relatif mahal sehingga tidak dapat dijangkau oleh seluruh lapisan masyarakat terutama masyarakat berekonomi rendah.^{9,10}

Chitosan (kitosan) merupakan turunan dari kitin biasanya terbuat dari cangkang hewan-hewan laut yang jumlahnya melimpah di Indonesia. Kitosan telah teruji memiliki sifat hypoallergenic, biodegradable, antifungi dan antimikroba. Kitosan memiliki sifat antibakteri karena gugus kation pada polimer tersebut (amino (NH₂)) mampu berikatan dengan gugus anion pada dinding sel bakteri yang kemudian akan menyebabkan lisisnya dinding sel bakteri tersebut sehingga perpindahan massa antar sel bakteri terhambat dan akhirnya akan mempercepat proses kematian bakteri.¹¹⁻¹⁴

Uji sifat antibakteri dan antifungi kitosan pernah dilakukan dengan

menggunakan pelarut asam asetat, hasilnya memperlihatkan pengaruh yang signifikan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dan *Candida albicans*, akan tetapi uji biokompatibilitasnya secara in-vitro dengan menggunakan MTS assay memperlihatkan sitotoksitas yang cukup tinggi, sehingga diperlukan alternatif pelarut kitosan yang memiliki biokompatibilitas baik.¹⁵⁻¹⁶ Asam askorbat atau yang biasa dikenal dengan vitamin C merupakan salah satu pelarut yang dapat digunakan untuk melarutkan kitosan. Asam askorbat memiliki efek yang menguntungkan antara lain sifatnya yang biokompatibel dan tidak beracun pada tubuh manusia, harganya yang terjangkau dan mudah didapat.¹⁷ Belum pernah dilakukan pengujian efektifitas antimikroba dan antifungi larutan kitosan dengan pelarut asam askorbat sebagai bahan perendam gigi tiruan sebagian lepasan. Berdasarkan latar belakang dan uraian tersebut di atas, maka pada penelitian ini peneliti membuat larutan kitosan berbagai konsentrasi pada pelarut asam askorbat untuk kemudian menguji aktifitas antibakteri dan antifunginya.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan alat penelitian ini dibagi menjadi empat sesuai dengan tahapan penelitian yaitu, pembuatan specimen plat resin akrilik polimerisasi panas, pembuatan larutan kitosan dengan pelarut asam askorbat, uji efektifitas antibakteri, dan uji efektifitas antifungi. Spesimen resin akrilik polimerisasi panas dibuat dengan bentuk persegi (10x10x2 mm) sesuai dengan petunjuk pabrik sebanyak 80 buah. Larutan kitosan dibuat dengan cara melarutkan bubuk kitosan pada pelarut asam askorbat dengan magnetic stirrer, komposisi sesuai dengan perbandingan yang diinginkan.

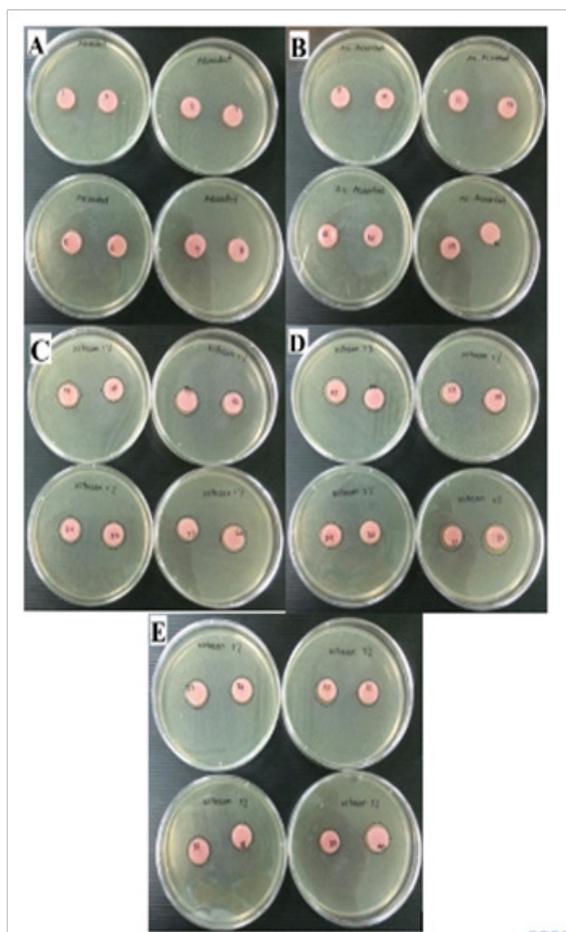
Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium yang terdiri dari dua penelitian untuk menguji efektifitas antimikroba dan antifungi. Spesimen pada masing-masing pengujian sejumlah 40 buah yang dibagi menjadi 5 kelompok (masing-

masing kelompok 8 spesimen) dengan perlakuan perendaman berbeda yaitu, kelompok kontrol (aquades) (Kelompok 1), asam askorbat saja (Kelompok 2), Kitosan 1% (Kelompok 3), Kitosan 2% (Kelompok 4), dan Kitosan 3% (Kelompok 5). Sebelum direndam dalam 5 larutan yang berbeda, plat resin akrilik direndam terlebih dahulu dalam aquades steril selama 24 jam untuk melepaskan sisa-sisa monomer kemudian dilakukan sterilisasi menggunakan autoclave. Kontaminasi resin akrilik pada *Streptococcus mutans* dan *Candida Albicans* dilakukan dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam. Plat akrilik yang sudah dikontaminasi direndam dalam tabung-tabung reaksi dengan 10 mL larutan berbeda (kelompok-kelompok perlakuan) selama 10 menit.

Pengujian efektifitas antifungi dilakukan setelah perendaman. Tabung reaksi divibrasi menggunakan vortex mixer selama 1 menit untuk melepaskan *Candida albicans* yang melekat pada plat akrilik. Setiap tabung dilakukan pengenceran seri sampai 10⁻², kemudian diambil 0,1 mL dan dimasukkan ke dalam saboraaud dextrose agar, untuk selanjutnya dilakukan spreading dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Jumlah koloni pada masing-masing media dihitung dengan menggunakan digital colony counter.

HASIL

Hasil uji difusi untuk melihat aktifitas antibakteri (*Streptococcus mutans*) memperlihatkan gambaran zona hambat seperti yang terlihat pada Gambar 1. Kelompok 1 dan 2 tidak memperlihatkan adanya zona hambat, artinya kelompok kontrol (aquades) dan kelompok asam askorbat tidak menunjukkan aktifitas antibakteri, sedangkan kelompok 3,4, dan 5 (larutan kitosan 1%, 2%, dan 3%) memperlihatkan adanya rerata zona hambat masing-masing sebesar 17,36 mm; 17,38 mm; dan 16,34 mm.



Gambar 1. Hasil Uji Difusi

Uji Angka Lempeng Total (ALT) dilakukan untuk menentukan reduksi bakteri secara kuantitatif pada kelompok kontrol media *Streptococcus mutans*, zona hambat yang terbentuk di sekeliling plat resin akrilik yang dicelupkan pada aquades sebagai kontrol negatif, serta pada perendaman dalam asam askorbat saja, kitosan 1%, 2%, dan 3% dengan hasil perbandingan seperti terlihat di Tabel 1.

Tabel 1. Perbandingan Jumlah Koloni *Streptococcus mutans*

Kelompok	Kontrol bakteri <i>Streptococcus mutans</i> (cfu/mL)	Jumlah <i>Streptococcus mutans</i> setelah dicelup (cfu/mL)
1	$1,87 \times 10^{11}$	$6,14 \times 10^9$
2	$1,87 \times 10^{11}$	$4,77 \times 10^7$
3	$1,87 \times 10^{11}$	$3,38 \times 10^3$
4	$1,87 \times 10^{11}$	$1,70 \times 10^3$
5	$1,87 \times 10^{11}$	$1,17 \times 10^4$

Kelompok kontrol memperlihatkan jumlah koloni bakteri terbanyak sedangkan kelompok

kitosan 1% (kelompok 3) memperlihatkan rerata jumlah koloni bakteri paling sedikit, hal ini menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri secara kuantitatif terbesar terdapat pada kelompok tersebut. Hasil uji ALT dianalisis secara statistik dengan menggunakan metode one-way ANOVA memperlihatkan $p = ,000 (<0,05)$ yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan seperti terlihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Uji One-way ANOVA pada Uji ALT

	Sum Squares	of df	Mean Square	F	Sig
Between Group	$1,503 \times 10^{20}$	4	$3,758 \times 10^{19}$	1999,386	,000
Within Group	$3,759 \times 10^{17}$	20	$1,880 \times 10^{16}$		
Total	$1,507 \times 10^{20}$	24			

Hasil uji aktivitas antifungi (*Candida albicans*) memperlihatkan rerata perhitungan seperti pada Tabel 3, dengan jumlah koloni terkecil pada kelompok kitosan 1% (kelompok 3) yaitu sebesar 4.082,5 cfu/mL dan koloni terbesar pada kelompok kontrol (aquades) sebesar 1.238.750 cfu/mL.

Tabel 3. Rerata jumlah koloni *Candida albicans* (cfu/mL)

Spesimen	Kelompok I	Kelompok II	Kelompok III	Kelompok IV	Kelompok V
1	1170000	23000	3670	10000	15000
2	1260000	20000	4330	9000	14330
3	1150000	22000	4330	10300	15670
4	1128000	20300	4000	10600	15330
5	1130000	19000	4330	9330	15670
6	1240000	22700	4670	9330	15000
7	1260000	19300	4000	10330	15000
8	1250000	19600	4330	9000	15330
Rata-rata	1238750	20737,5	4082,5	9738,25	15166,25

Analisis statistik untuk hasil uji aktivitas antifungi dilakukan dengan menggunakan metode Kruskal-Wallis memperlihatkan nilai chi-square rerata jumlah koloni tiap kelompok sebesar 37,513 dengan signifikansi 0,000 ($p < 0,05$) yang artinya terdapat perbedaan yang signifikan antara tiap kelompok.

PEMBAHASAN

Hasil penelitian uji aktivitas antimikroba

pada *Streptococcus mutans* dan antifungi pada *Candida albicans* yang merupakan mikroorganisme patogen pada rongga mulut serta dapat menyebabkan terjadinya denture stomatitis. Penelitian ini memperlihatkan hasil yang signifikan dengan nilai rerata terbaik pada kelompok 3 yaitu kelompok perendaman resin akrilik polimerisasi panas pada larutan kitosan 1% dalam pelarut asam askorbat. Hal ini menunjukkan bahwa kitosan dapat dilarutkan dalam asam askorbat dan dapat dengan efektif menghambat pertumbuhan mikroorganisme.¹⁷

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi pada MHA dan ALT pada jenis agar yang sama. Kitosan dengan pelarut asam askorbat memperlihatkan kemampuan antibakteri. Kitosan memiliki gugus fungsional amino (-NH₂) yang dapat berikatan dengan Ca²⁺ yang bermuatan negatif pada dinding sel bakteri melalui interaksi elektrostatis. Interaksi ini menyebabkan dinding sel bakteri kehilangan kemampuan untuk mengatur pertukaran zat-zat dari dalam keluar yang pada akhirnya mengakibatkan lisisnya sel bakteri.¹⁸

Mekanisme antifungi kitosan hampir sama dengan aktifitas antibakterinya, akan tetapi efeknya pada fungi lebih bersifat menghentikan pertumbuhan daripada mematikannya. Aktivitas antifungi kitosan disebabkan oleh sifat kationiknya. Muatan positif dari kitosan menyebabkan interaksi dengan muatan negatif pada komponen fosfolipid membran sel fungi. Hal ini menyebabkan peningkatan permeabilitas membran dan menyebabkan kebocoran isi sel fungi.^{19,20}

Hasil uji aktifitas antibakteri dan antifungi pada penelitian ini menunjukkan konsentrasi terbaik dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme adalah konsentrasi kitosan 1%. Hal ini sejalan dengan penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Sarah dan Sofika yang menunjukkan bahwa konsentrasi kitosan yang optimal dalam menghambat pertumbuhan fungi adalah 1%.²¹ Begitu juga dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Mahatmanti yang menunjukkan bahwa pada konsentrasi yang sama, aktifitas

penghambatan pertumbuhan bakterinya paling baik.²² Semakin tinggi konsentrasi kitosan (>2%) akan menyebabkan peningkatan viskositas larutan begitu juga dengan ukuran partikelnya. Semakin kecil ukuran partikel maka viskositas semakin rendah sehingga daya larut semakin baik sehingga semakin mudah terabsorpsi pada resin akrilik polimerisasi panas.²³

Penelitian sebelumnya telah berhasil menguji aktivitas antimikroba dan antifungi kitosan dengan pelarut asam asetat, namun setelah dilakukan uji biokompatibilitas pada sel fibroblast hasilnya memperlihatkan kecenderungan toksisitas.^{15,16} Kitosan dapat larut dengan mudah pada asam kuat. Asam askorbat merupakan senyawa yang mudah larut dalam air, memiliki sifat asam dan merupakan pereduksi yang kuat. Asam askorbat atau yang pada umumnya dikenal sebagai Vitamin C terdapat pada pangan nabati seperti sayur dan buah yang bersifat asam.¹⁷ Asam askorbat yang digunakan pada penelitian ini terbukti dapat melarutkan kitosan dengan baik serta mempertahankan aktivitas antibakteri dan antifunginya. Asam askorbat juga memiliki biokompatibilitas yang sangat baik pada jaringan tubuh selain itu asam askorbat dapat meningkatkan pertumbuhan dan perbaikan jaringan terutama di rongga mulut. Asam askorbat juga merupakan antioksidan yang dapat menghambat kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas sehingga diharapkan selain sebagai pelarut juga memiliki efek yang menguntungkan bagi mukosa rongga mulut yang berkontak dengan resin akrilik polimerisasi panas yang telah direndam oleh larutan kitosan 1%, namun hal ini masih membutuhkan penelitian lebih lanjut baik secara *in vitro* maupun *in vivo*.²⁴

SIMPULAN

Kitosan yang dilarutkan pada pelarut asam askorbat memiliki aktifitas antimikroba dan antifungi. Kitosan pada pelarut asam askorbat dapat secara signifikan menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans* dan *Candida albicans* pada lempeng akrilik polimerisasi panas. Konsentrasi kitosan yang paling baik dalam dalam menghambat

mikroorganisme tersebut adalah 1%. Masih perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang biokompatibilitas larutan kitosan dalam asam askorbat terhadap sel.

DAFTAR PUSTAKA

1. Esan TA, Olusile AO, Akeredolu PA, Esan AO. Socio-demographic factors and edentulism: the Nigerian experience. *BMC Oral Health*; 2004; 4(3): 1-6
2. Suresh S, Sharma S. A Clinical Survey to Determine the Awareness and Preference of Needs of a complete denture among complete edentulous. *J. Int Oral Health*; 2010; (2): 65-70
3. Carr AB, McGivney GP, Brown DT. McCracken's Removable Partial Prosthodontics. 11th ed. St.Louis : Elsevier Mosby; 2005: 29-55
4. The Academy of Denture Prosthetics. The Glossary of Prosthodontics Terms. 8th ed. *J Prosthet Dent*; 2005; 94(1): 10-92
5. Anusavice JK. Philips' Science of Dental Materials. 11th ed. Philadelphia Saunders Elsevier; 2003; 721-57
6. Gharechahi M, Moosavi H, Forghani M. Effect of Surface Roughness and Materials Composition on Biofilm Formation. *Journal of Biomaterial and Nanobiotechnology*; 2012; (3): 541-546
7. Young B, Jose A, Cameron D, McCord F, Murray C, Bagg J, et al. Attachment of *Candida albicans* to denture base acrylic resin processed by three different methods. *The International Journal of Prosthodontic*; 2009; 22(5): 488-489
8. Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, et al. *Candida*-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*; 2011 : 16(1): e139-43
9. Lee HE, Li CY, Chang HW, Yang YH, Wu JH. Effect of Different Denture Cleaning Methods to Remove *Candida albicans* from Acrylic Resin Denture Based Material. *Journal of Dental Sciences*; 2011; (6): 216-20
10. Shakya P, Jain D, Rahangdale T. Evaluation and Comparison of Effect of Delmopinol Application on Adherence of *Candida albicans* on Denture Fitting Surface on Three Types of Acrylic Resin : An in vitro study. *International Journal of Prosthodontics and Restorative Dentistry*; 2012; 2(4): 129-35