

**PENGARUH KHITOSAN TERHADAP ISOLAT
Staphylococcus epidermidis PENYEBAB KETOMBE**

SKRIPSI



Oleh :

**DEWI NURHAYATI
02613150**

**JURUSAN FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA
DESEMBER 2006**

**PENGARUH KHITOSAN TERHADAP ISOLAT
Staphylococcus epidermidis PENYEBAB KETOMBE**

SKRIPSI

**Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi
(S. Farm.)**

**Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia Yogyakarta**



Oleh :

**DEWI NURHAYATI
02613150**

**JURUSAN FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA
DESEMBER 2006**

SKRIPSI

**PENGARUH KHITOSAN TERHADAP ISOLAT
Staphylococcus epidermidis PENYEBAB KETOMBE**

Oleh :

**DEWI NURHAYATI
02613150**

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia

Tanggal : 14 Desember 2006

Ketua Penguji,



Endang Darmawan, M.Si., Apt.

Anggota Penguji,

Anggota Penguji,



Dra. Th. Tri Suharni M.



Indah purwantini, M.Si., Apt.

Mengetahui

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia



Endang Darmawan, M. Si., Apt.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahil'alamin, segala puji bagi Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini, yang merupakan salah satu syarat untuk menyelesaikan program S1 Jurusan Farmasi Universitas Islam Indonesia.

Pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada pihak-pihak yang telah memberikan bantuan, dorongan, serta pengarahan-pengarahan untuk membimbing penulis dalam menyelesaikan penulisan skripsi.

1. Endang Darmawan, M. Si., Apt. Selaku pembimbing utama dalam penelitian ini, terimakasih atas segala bantuan, bimbingan dan arahan selama menyelesaikan skripsi, terimakasih atas semua ilmu yang telah diberikan semoga dapat bermanfaat dikemudian hari.
2. Dra. Th. Tri Suharni M. Selaku pembimbing pendamping dalam penelitian ini, terimakasih atas segala bantuan, bimbingan, arahan serta ilmu yang telah diberikan selama penulis menyelesaikan skripsi.
3. Sri Mulyaningsih , M. Si., Apt selaku pembimbing dalam penelitian ini, terimakasih atas segala bantuan, bimbingan dan arahan selama menyelesaikan skripsi, terimakasih atas semua ilmu yang telah diberikan semoga dapat bermanfaat dikemudian hari.
4. Feris Firdaus, S. Si. Terimakasih atas bimbingan dan semua masukan yang telah diberikan kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
5. Indah Purwantini, M. Si., Apt. Selaku dosen penguji, terimakasih atas semua saran dan masukan yang sangat berharga bagi penulis.
6. Seluruh dosen jurusan farmasi, terimakasih atas semua bekal ilmu yang diberikan, semoga dapat bermanfaat bagi penulis.
7. Seluruh staf UII terimakasih atas kerjasama yang terjalin dan segala pelayanan yang telah diberikan.
8. Laboran laboratorium teknologi sediaan farmasi (mas Hartanto), Laboran laboratorium farmakologi (pak Marno), Laboran laboratorium kimia analisis (mas Kus), laboran laboratorium mikrobiologi (mbak Dyah) serta seluruh laboran yang telah memberikan bantuan, arahan dan kerjasamanya selama ini.
9. Laboran laboratorium mikrobiologi fakultas biologi UGM (mas Marno dan bu Partini), terimakasih atas semua keramahan dan bantuan yang diberikan kepada penulis selama penelitian.
10. Bapak dan Ibuku terimakasih atas semua doa, dorongan, kasih sayang dan kepercayaan yang telah diberikan.
11. Kakak dan adikku, terimakasih atas doa dan kasih sayang yang telah diberikan.
12. Masku, tetaplah jadi sandaran hatiku, terimakasih karena engkau selalu ada untukku.
13. Yeni (terimakasih atas doanya ya.), Yulika, Miko..(teman-teman seperjuanganku).
14. Seluruh leopard tercinta, terimakasih atas persahabatan yang telah terjalin, semoga selalu sukses.

15. Serta semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu baik langsung maupun tidak langsung telah ikut membantu dalam keberhasilan penelitian ini.

Penulis menyadari dalam penyusunan skripsi ini masih banyak kekurangan sehingga saran dan kritik sangat penulis harapkan. Semoga penelitian ini dapat memberikan kontribusi dalam penelitian dan pengembangan ilmu pengetahuan di Indonesia.

Yogyakarta, Desember 2006

Penulis



DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL DEPAN	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PENGESAHAN PEMBIMBING	iii
HALAMAN PENGESAHAN PENGUJI	iv
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN PENELITIAN	v
HALAMAN PERSEMBAHAN	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
INTISARI	xiv
ABSTRAK	xv
BAB I PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang Masalah.....	1
B. Perumusan Masalah.....	2
C. Tujuan Penelitian.....	2
D. Manfaat Penelitian.....	3
BAB II STUDI PUSTAKA	
A. Tinjauan Pustaka.....	4
1. Khitin.....	4
2. Khitosan.....	5
3. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	7
4. Ketombe.....	8
5. Isolasi dan identifikasi <i>Staphylococcus epidermidis</i>	9
6. Antibakteri.....	10
7. Pemeriksaan mikrobiologi.....	10
8. Media.....	12
9. Sterilisasi.....	14
B. Landasan Teori.....	14
C. Hipotesis.....	15
BAB III METODE PENELITIAN	
A. Bahan dan Alat.....	16
B. Cara Penelitian.....	17
1. Pembuatan khitosan.....	17
2. Pembuatan nutrien cair.....	18
3. Pembuatan nutrien agar.....	18
4. Identifikasi <i>Staphylococcus epidermidis</i>	18
5. Pembuatan inokulum <i>Staphylococcus epidermidis</i>	20
6. Uji daya antibakteri khitosan terhadap <i>Staphylococcus epidermidis</i>	20
C. Analisis Hasil.....	28

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	29
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
A. Kesimpulan	39
B. Saran	39
DAFTAR PUSTAKA.....	40
LAMPIRAN.....	43



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Struktur khitin	4
Gambar 2. Struktur khitosan	7
Gambar 3. Skema pembuatan khitosan.....	23
Gambar 4. Skema pengambilan specimen	24
Gambar 5. Skema identifikasi <i>Staphylococcus epidermidis</i>	25
Gambar 6. Skema uji pengaruh khitosan terhadap <i>Staphylococcus epidermidis</i> dengan metode difusi padat cara sumuran dalam media nutrien agar.....	26
Gambar 7. Skema uji pengaruh khitosan terhadap <i>Staphylococcus epidermidis</i> dalam media nutrien cair	27
Gambar 8. Reaksi deasetilasi khitin oleh NaOH	30
Gambar 9. Kurva penghambatan <i>Staphylococcus epidermidis</i> oleh khitosan dalam media nutrien cair	37
Gambar 10. Khitosan	48
Gambar 11. Khitosan yang dilarutkan dalam asam asetat glasial 0,1%	48
Gambar 12. Pertumbuhan <i>Staphylococcus epidermidis</i> dalam media agar darah	48
Gambar 13. Hasil uji katalase	49
Gambar 14. Hasil fermentasi glukosa	49
Gambar 15. Hasil fermentasi manitol	49
Gambar 16. Hasil fermentasi fruktosa	50
Gambar 17. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	50
Gambar 18. Hasil uji aktivitas khitosan terhadap <i>Staphylococcus epidermidis</i> dengan metode difusi padat cara sumuran dalam media nutrien agar.....	50
Gambar 19. Hasil uji penghambatan <i>Staphylococcus epidermidis</i> oleh khitosan dalam media nutrien cair	51

PENGARUH KHITOSAN TERHADAP ISOLAT *Staphylococcus epidermidis* PENYEBAB KETOMBE

INTISARI

Potensi udang diindonesia rata-rata meningkat sebesar 7,4% pertahun, sehingga limbah yang dihasilkan sangat besar. Limbah udang mengandung konstituen utama yang terdiri dari protein, kalsium karbonat, khitin, pigmen dan abu. Khitin jika diproses lebih lanjut akan dihasilkan khitosan. Khitosan telah diteliti oleh Tsai dan Su (1999) memiliki sifat antibakteri, sehingga diperkirakan khitosan dapat digunakan sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus epidermidis* penyebab ketombe. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membuktikan apakah khitosan memiliki potensi untuk dimanfaatkan sebagai bahan baku antiketombe dan meneliti pengaruh khitosan terhadap isolat *Staphylococcus epidermidis* penyebab ketombe. Cara penelitian adalah dengan pembuatan khitosan dari cangkang udang, pengambilan specimen ketombe kemudian dilakukan isolasi di bagian mikrobiologi fakultas kedokteran UGM dan identifikasi *Staphylococcus epidermidis*, dan penentuan aktivitas khitosan dilakukan dengan difusi padat cara sumuran dalam media nutrien agar dan uji penghambatan *Staphylococcus epidermidis* oleh khitosan dalam media nutrien cair. Hasil penelitian didapatkan uji difusi padat cara sumuran dalam media nutrien agar menunjukkan tidak ada zona hambatan oleh khitosan dan dari uji penghambatan *Staphylococcus epidermidis* oleh khitosan dalam media nutrien cair didapat nilai g dari perlakuan dengan khitosan 0,5% : 6,097 jam dan 5,88 jam dan perlakuan tanpa khitosan 0,5% didapat nilai g : 5,88 jam dan 2,347, Dari hasil ini disimpulkan bahwa khitosan belum dapat memberikan hambatan terhadap pertumbuhan *Staphylococcus epidermidis*.

Kata kunci : khitosan, antibakteri, *Staphylococcus epidermidis*, ketombe.

INFLUENCE OF CHITOSAN TO ISOLAT *Staphylococcus epidermidis* CAUSES OF DANDRUFF

ABSTRACT

Potential shrimp in indonesia increase average as big as 7,4 % every year, so the waste that produced very big. Shrimp waste contains principal constituen that consist of protein, carbonate calcium, chitin, pigment and ash. Chitin in further processed will be produced chitosan. chitosan researched by tsai and su (1999) has antibacteria properties, so that be estimated chitosan can use as antibacteria to *Staphylococcus epidermidis* causes of dandruff. The aim of the research was to prove that chitosan has potential to use as raw material of antidandruff and research influence of chitosan to isolat *Staphylococcus epidermidis* causes of dandruff. The research done with make chitosan from shrimp eggshell, taking specimen dandruff then isolation in microbiology part, faculty of mediciness and identification of *Staphylococcus epidermidis*, and determination of chitosan activity by solid diffusion test with sumuran method in nutrient agar medium and inhibition test of *Staphylococcus epidermidis* by chitosan in nutrient broth medium. Result of the research of solid diffusion test with sumuran method in nutrient agar medium shows there is no inhibition zone by chitosan and from inhibition test of *Staphylococcus epidermidis* by chitosan in nutrient broth medium is got value of k from treatment with chitosan 0,5%: 6,097 h and 5,88 h and treatment without chitosan 0,5% got value of k: 5,88 h and 2,347 h, from this result is concluded that chitosan can't give inhibition to *Staphylococcus epidermidis* growth.

keyword: chitosan, antibacteria, *Staphylococcus epidermidis*, dandruff.

BAB I

PENDAHULUAN



A. Latar Belakang Masalah

Selama ini potensi udang Indonesia rata-rata meningkat sebesar 7,4 % per tahun. Limbah yang dihasilkan dari proses pembekuan udang, pengalengan udang dan pengolahan kerupuk udang berkisar antara 30 – 75 % dari berat total udang (bagian kulit, kepala dan ekor). Jadi jumlah bagian yang terbuang dan menjadi limbah dari usaha pengolahan udang tersebut sangat tinggi. Limbah udang mengandung konstituen utama yang terdiri dari protein, kalsium karbonat, khitin, pigmen dan abu. Khitin jika diproses lebih lanjut dengan melalui beberapa tahap, akan dihasilkan khitosan. Kulit udang yang mengandung senyawa kimia khitin dan khitosan merupakan limbah yang mudah didapat dan tersedia dalam jumlah yang banyak, yang selama ini belum dimanfaatkan secara optimal (Marganof, 2004; Prasetyo, 2004). Meningkatnya jumlah limbah udang masih merupakan masalah serius yang perlu dicarikan upaya pemanfaatannya khususnya di Indonesia. Hal ini bukan saja memberikan nilai tambah pada usaha pengolahan udang tetapi juga dapat menanggulangi masalah pencemaran lingkungan hidup yang ditimbulkan, terutama masalah bau yang dikeluarkan serta estetika lingkungan yang kurang bagus (Manjang, 1993).

Penelitian terbaru tentang aktivitas antibakteri dari khitosan menunjukkan bahwa khitosan efektif digunakan sebagai antibakteri (No dkk., 2002). Menurut Tsai dan Hsu (1999) khitosan memiliki kerja antibakteri dengan mekanisme kerja meliputi ikatan silang antara polikation dari khitosan dan anion pada permukaan bakteri yang mengubah permeabilitas membran.

Di lain pihak ketombe merupakan salah satu penyakit yang bisa disebabkan oleh banyak faktor, salah satunya adalah bakteri. Menurut Kligman (2005) pada pasien dengan ketombe, jumlah mikroflora normal pada kulit kepala mengalami peningkatan jumlah, mikroflora yang biasa ditemukan yaitu (1) *Pityrosporum*, (2)

Aerobik coccus, dan (3) *Corynebacterium acnes*. Jika seseorang mengalami gangguan karena ketombe, maka sel yang mati akan meningkatkan kematian sel kulit kepala (Squeo dkk., 1998). Oleh karena itu proses perbaikan kulit kepala meningkat. Kulit kepala yang terkelupas menjadi kotoran di rambut kepala dan lebih lanjut akan menyebabkan infeksi pada kulit kepala (Nweze, 2001).

Obat-obat antiketombe yang beredar dipasaran umumnya mengandung bahan-bahan logam berat. Komposisi yang sering terdapat dalam shampo antiketombe seperti selenium sulfida dan *zinc pyrithione*. Namun demikian selenium sulfida dan *zinc pyrithione* memiliki harga yang relatif tinggi dan memiliki toksisitas yang tinggi terhadap hati, yaitu nekrosis sel hati dan kulit kepala (Ohlendorf, 1996). Berdasarkan alasan tersebut maka perlu dicari agen yang berasal dari alam yang memiliki aktivitas yang baik dan toksisitas yang lebih rendah.

B . Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah tersebut di atas maka dapat dirumuskan masalah yang akan diangkat dan dicarikan solusinya adalah :

Apakah khitin yang diisolasi dari cangkang udang dan disintesis menjadi khitosan memiliki potensi untuk dimanfaatkan sebagai bahan baku agen antibakteri terhadap *Staphylococcus epidermidis* penyebab ketombe dan bagaimana hasil uji aktivitas khitosan terkait dengan daya antibakteri khitosan terhadap *Staphylococcus epidermidis* penyebab ketombe ?

C. Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah tersebut di atas maka dapat dirumuskan tujuan penelitian yang akan dicapai secara khusus dalam penelitian ini adalah :

Membuktikan apakah khitin yang diisolasi dari cangkang udang dan disintesis menjadi khitosan memiliki potensi untuk dimanfaatkan sebagai bahan baku agen

antibakteri dan melakukan pengujian aktivitas khitosan terkait dengan daya antibakteri khitosan terhadap *Staphylococcus epidermidis* penyebab ketombe.

D. Manfaat Penelitian

Melihat kecenderungan konsumsi udang yang meningkat di tahun-tahun mendatang, maka perlu mengantisipasi peningkatan jumlah limbah udang, yang bila dibuang begitu saja akan menyebabkan pencemaran dan mengganggu lingkungan. Oleh sebab itu alternatif pemanfaatannya sebagai material baru akan sangat menguntungkan. Limbah udang mengandung 20-30 % khitin yang dengan pengolahan lebih lanjut dihasilkan khitosan. Polimer khitosan dapat dimanfaatkan secara luas diberbagai bidang yang meliputi industri, pertanian, biomedis, bioteknologi dan kesehatan. Salah satu sifat yang penting dari polimer ini adalah kemampuannya sebagai antibakteri. Memperhatikan potensi dan prospek pemanfaatan polimer ini untuk industri kesehatan seperti antibakteri dan pelindung kulit maka polimer khitosan sangat potensial untuk dikembangkan sebagai antiketombe.

BAB II STUDI PUSTAKA

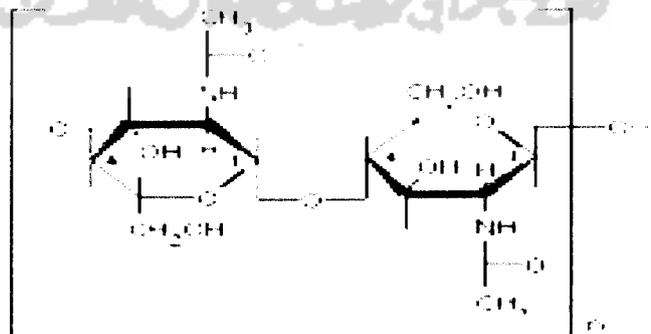
A. Tinjauan Pustaka

1. Khitin

Sebagian besar limbah udang berasal dari kulit, kepala, dan ekornya. Fungsi kulit tersebut pada hewan udang (hewan golongan invertebrata) yaitu sebagai pelindung (Neely dan Wiliam, 1969). Kulit udang mengandung protein (25 % - 40%), kalsium karbonat (45% - 50%), dan khitin (15% - 20%) (Focher dkk., 1992).

Khitin merupakan polisakarida, tersusun dari unit-unit asetilglukosamin (lebih lengkapnya N asetil-D-gluko-2-amin) yang terikat dengan ikatan β -1,4, sama dengan glukosa unit yang menyusun selulosa. Jadi khitin merupakan selulosa dengan gugus hidroksil pada tiap monomer diganti dengan gugus asetil amino. Yang meningkatkan ikatan hidrogen antar polimer yang berdekatan, sehingga meningkatkan kekuatan ikatan. Senyawa ini merupakan komponen utama rangka luar beberapa serangga. Khitin memiliki muatan positif yang kuat, sehingga bisa mengikat permukaan yang bermuatan negatif termasuk logam, kulit dan makromolekul seperti protein, kolesterol, lipid dan lemak (Anonim, 2005).

Khitin tidak larut dalam air dan tahan terhadap hidrolisis menjadi komponen sakaridanya. Kelarutan khitin meningkat pada penambahan asam mineral kuat seperti asam nitrat dan asam hidroklorat (Pujiastuti, 2004).



Gambar 1. Struktur Khitin (Anonim, 2005).

2. Khitosan

Khitosan merupakan hasil hidrolisa kimiawi maupun enzimatik dari senyawa khitin. Khitosan merupakan khitin yang telah dihilangkan gugus asetilnya melalui proses deasetilasi, yang biasanya dilakukan dengan soda (Pujiastuti, 2004). Khitosan memiliki keuntungan dibandingkan khitin, yaitu untuk melarutkan khitin, pelarut yang bersifat toksik seperti litium klorida dan dimetilasetamid dibutuhkan, sedangkan khitosan dapat dilarutkan dalam asam asetat. Keuntungan yang kedua adalah khitosan memiliki gugus amin bebas yang merupakan gugus aktif pada beberapa reaksi kimia (Knoul dkk., 1999).

a. Kelarutan khitosan :

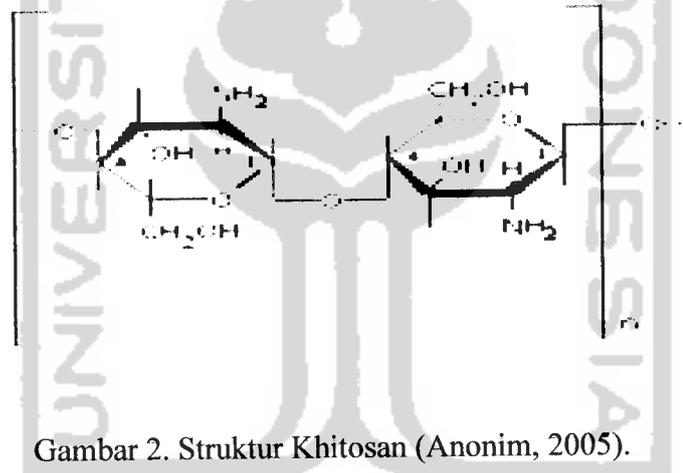
Walaupun khitin tidak larut dalam banyak pelarut organik, khitosan larut dalam larutan asam dibawah pH 6, asam organik seperti asam asetat, asam format dan asam laktat digunakan untuk melarutkan khitosan. Yang paling umum digunakan adalah 1% asam asetat pada pH \pm 4, khitosan juga dapat larut dalam 1% asam hidroklorida tetapi tidak larut dalam sulfur dan asam fosfat. Kelarutan khitosan dalam asam anorganik cukup terbatas. Diatas pH 7 stabilitas kelarutan khitosan rendah, pada pH yang lebih tinggi, pengendapan atau pembentukan gel cenderung terjadi dan larutan khitosan membentuk poli-ion kompleks dengan anionik hidrokoloid yang dihasilkan pada pembentukan gel (Kurita, 1998). Khitosan memiliki sifat larut dalam suatu larutan asam organik, tetapi tidak larut dalam pelarut organik lainnya seperti dimetil sulfoksida, tidak larut pada pH 6,5 (Prasetyo, 2004). Tidak larut dalam air, larutan basa kuat dan dalam H₂SO₄, sedikit larut dalam HCl, HNO₃, dan H₃PO₄ (Muzzarelli, 1986). Sedangkan pelarut khitosan yang baik adalah asam asetat (Prasetyo, 2004)

Kelarutan juga dikendalikan oleh derajat deasetilasi dan diperkirakan derajat deasetilasi minimal 85% agar tercapai kelarutan yang diinginkan (No dkk., 1995). Khitosan yang dapat larut dalam asam hingga >95% dalam 1% asam asetat pada kadar 0,5% dihasilkan dengan perlakuan khitin murni dengan 45-50% NaOH selama 10-30 menit. Khitosan dengan perlakuan 45% NaOH selama 5 menit, dan atau dengan 40% NaOH selama 30 menit, tidak cukup terdeasetilasi untuk bisa larut dalam 1% asam asetat (Anonim, 2005).

asam sulfat menghasilkan warna violet, perubahan warna coklat menjadi violet menunjukkan adanya khitin (Pujiastuti, 2004).

Kualitas khitosan yang dihasilkan dapat dilihat dari derajat deasetilasinya. Khitosan yang memiliki derajat deasetilasi $\pm 85\%$ dikatakan berkualitas teknis, Khitosan dengan derajat deasetilasi $\pm 90\%$ dikatakan berkualitas makanan, sedangkan khitosan yang memiliki derajat deasetilasi $\pm 95\%$ dikatakan berkualitas pharmaceutical grade. Untuk uji derajat deasetilasi digunakan *nuclear magnetic resonance spectroscopy* dengan λ 525 nm (Pujiastuti, 2004).

Khitosan telah banyak digunakan dalam bidang farmasi dan kesehatan, antara lain sebagai antidiabetes mellitus, antihiperlipidemia, antijamur, bahan baku teknologi farmasi (Okawa dkk., 2003).



3. *Staphylococcus epidermidis*

Divisi	: Protophyta
Kelas	: Schzomycetes
Ordo	: Eubacteriales
Famili	: Micrococcaceae
Genus	: Staphylococcus
Spesies	: <i>Staphylococcus epidermidis</i>

Staphylococcus berasal dari perkataan *staphyl* yang berarti kelompok buah anggur dan *coccus* yang berarti benih bulat. Bakteri ini sering ditemukan sebagai flora normal pada kulit dan selaput lendir pada manusia. Dapat menjadi penyebab infeksi baik pada manusia maupun pada hewan (Anonim, 1994).

Infeksi oleh jenis bakteri ini terutama menimbulkan penyakit pada manusia. Setiap jaringan ataupun alat tubuh dapat diinfeksi olehnya dan menyebabkan timbulnya penyakit dengan tanda-tanda yang khas, yaitu: peradangan, nekrosis dan pembentukan abses. *Staphylococcus epidermidis* merupakan penyebab infeksi kulit yang ringan yang disertai pembentukan abses. Bakteri ini juga disebut sebagai *Staphylococcus albus*, koloninya berwarna putih atau kuning, susunan berpasangan atau bergerombol, suhu pertumbuhan 15°C-40°C, suhu pertumbuhan optimum 35°C, pH optimum 7,4 dan bersifat anaerob fakultatif, bakteri ini bersifat koagulasi negatif, memfermentasi glukosa, tidak memfermentasi manitol (Anonim, 1994). Koloninya pada agar darah berwarna putih dan tidak memperlihatkan hemolisis disekitarnya (Julius, 1990). Pada media nutrisi cair memiliki waktu generasi berkisar antara 44-98 menit (Gottenbos dkk., 2000).

4. Ketombe

Ketombe (*dandruff*) merupakan penyebab gangguan pada kulit kepala. Jika seseorang mengalami gangguan karena ketombe, maka sel yang mati akan meningkatkan kematian sel kulit kepala (Squeo dkk., 1998). Pada penderita ketombe yang parah, kulit kepalanya memerah dan terasa gatal dimana kondisi ini dapat menyebabkan iritasi yang hebat pada kulit kepala (Stice, 2005).

Pada prinsipnya, ada tiga macam usaha untuk mengobati ketombe (Wasitaatmadja, 1997), yaitu:

- (a) Usaha untuk menurunkan minyak permukaan kulit atau jumlah sekresi sebum.
- (b) Usaha untuk menurunkan jumlah bakteri penyebab ketombe.
- (c) Usaha untuk mengurangi gejala sisi, gatal, dan rambut rontok.

Obat-obat anti ketombe yang beredar di pasaran umumnya mengandung bahan-bahan logam berat. Komposisi yang sering terdapat dalam shampo antiketombe adalah

selenium sulfida dan *zinc pyrithione*. Namun demikian selenium sulfida dan *zinc pyrithione* memiliki harga yang relatif tinggi dan toksisitas yang tinggi terhadap hati, yaitu nekrosis sel hati dan kulit kepala (ohlendorf, 1996).

Jumlah mikroflora normal pada kulit kepala jika dibandingkan secara kuantitatif pada individu normal dan pada pasien dengan ketombe dan seborrheic dermatitis, gangguan ditandai dengan peningkatan jumlah mikroflora tersebut. Tiga organisme yang biasanya ditemukan: (1) *Pityrosporum*, (2) Aerobik coccus, dan (3) *Corynebacterium acnes* (Kligman dkk., 2005).

5. Isolasi dan identifikasi bakteri

Mengisolasi suatu bakteri ialah memisahkan bakteri tersebut dari lingkungannya di alam dan menumbuhkannya sebagai biakan murni dalam media buatan. Ada bermacam-macam cara untuk mengisolasi bakteri. Beberapa hal yang harus diperhatikan dalam mengisolasi bakteri yaitu (Jutono dkk., 1973) :

- (1) Sifat-sifat spesies bakteri yang akan diisolasi
- (2) Tempat hidup atau asal bakteri tersebut
- (3) Media untuk pertumbuhannya yang sesuai
- (4) Cara menanam bakteri tersebut
- (5) Cara inkubasi bakteri tersebut
- (6) Cara menguji bahwa bakteri yang diisolasi telah berupa biakan murni dan sesuai dengan yang dimaksud
- (7) Cara memelihara agar bakteri yang telah diisolasi tetap merupakan biakan murni

Bakteri dapat diisolasi dengan cara goresan dan taburan. Cara goresan dasarnya ialah menggoreskan suspensi bahan yang mengandung bakteri pada permukaan media agar yang sesuai dalam petridish. Setelah inkubasi, maka pada goresan akan tumbuh koloni-koloni terpisah yang mungkin berasal dari satu sel bakteri, sehingga dapat diisolasi lebih lanjut. Sedangkan pada cara taburan pada dasarnya ialah menginokulasi media agar yang sedang mencair pada temperatur 50°C dengan suspensi bakteri uji dan menuangkannya pada petridish steril. Setelah inkubasi akan terlihat koloni-koloni

tersebar dipermukaan agar yang mungkin berasal dari satu sel bakteri, sehingga dapat diisolasi lebih lanjut (Jutono dkk., 1973).

6. Antibakteri

Antibakteri adalah zat yang digunakan untuk membasmi bakteri penyebab infeksi pada manusia, ditentukan harus memiliki sifat toksisitas selektif setinggi mungkin, artinya obat tersebut haruslah bersifat sangat toksik untuk bakteri, tetapi relatif tidak toksik untuk inang. Sifat toksisitas selektif yang absolut belum atau mungkin juga tidak akan diperoleh (Ganiswara, 1995).

Berdasarkan sifat toksisitas selektif, ada antibakteri yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri dikenal dengan aktivitas bakteristatik, ada yang bersifat membunuh bakteri, dikenal sebagai aktivitas bakterisid. Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan bakteri atau membunuhnya, masing-masing dikenal sebagai kadar hambat minimal (KHM) dan kadar bunuh minimal (KBM) (Ganiswara, 1995).

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antibakteri dibagi sebagai berikut: mengganggu metabolisme sel bakteri, menghambat sintesis / merusak dinding sel bakteri, mengganggu permeabilitas membran sel bakteri, menghambat sintesis / mendenaturasi protein sel bakteri, menghambat sintesis atau merusak asam nukleat sel bakteri, menghambat kerja enzim dari bakteri (Ganiswara, 1995; Pelczar dan Chan, 2000).

7. Pemeriksaan mikrobiologi :

a. Dilusi cair atau dilusi padat

Pada prinsipnya antibakteri diencerkan hingga diperoleh beberapa konsentrasi. Pada dilusi cair, masing-masing konsentrasi antibakteri ditambah suspensi bakteri dalam media; sedangkan pada dilusi padat tiap konsentrasi antibakteri dicampur dengan media agar, lalu diinokulasi bakteri (Julius, 1990).

1. Dilusi Cair

Pada cara ini zat antibakteri yang akan diuji aktivitasnya diencerkan secara serial dengan metode pengenceran kelipatan dua didalam medium cair, dan selanjutnya diinokulasikan dengan bakteri uji. Setelah diinkubasi pada temperatur 37°C selama 18-24 jam, aktivitas zat antibakteri ditentukan dengan konsentrasi hambat minimal (KHM), yaitu zat berkhasiat dengan konsentrasi terendah yang masih dapat menghambat pertumbuhan bakteri (Lorian, 1980).

2. . Dilusi Padat

Pada cara ini zat yang akan diuji aktivitas antibakterinya diencerkan secara serial dengan metode pengenceran kelipatan dua didalam medium agar, temperatur 40-50°C dan selanjutnya diinokulasikan dengan bakteri uji. Setelah diinkubasi pada temperatur 37°C selama 18-24 jam, aktivitas zat antibakteri ditentukan dengan konsentrasi hambat minimal (KHM), yaitu zat berkhasiat dengan konsentrasi terendah yang masih dapat menghambat pertumbuhan bakteri (Lorian, 1980).

b. Difusi cair atau difusi padat

Media yang dipakai adalah media agar. Dasar dari percobaan ini adalah dengan membiarkan obat berdifusi ke perbenihan padat. Kadar obat tertinggi tercapai pada daerah di tempat pemberian antibakteri dan makin jauh makin berkurang (Julius , 1990).

Ada banyak cara-cara penerapan uji difusi ini. Yang paling sering dilakukan ialah menggunakan cakram kertas saring yang diberi antibakteri (cara difusi cakram). Disini cakram kertas saring bergaris tengah 6 mm diisi dengan konsentrasi antibakteri yang diinginkan, lalu dikeringkan dalam keadaan dingin. Penanaman biakan cair bakteri dilakukan dengan menyebarkannya dengan kapas usap pada permukaan perbenihan padat. Sesudah dikeringkan pada 37°C selama setengah jam, diatas permukaan perbenihan ditempelkan cakram antibakteri dengan menggunakan penjepit steril. Sesudah diinkubasi selama semalam pada suhu 37°C terlihat zona hambatan disekeliling cakram antibakteri. Lebarnya zona hambatan menunjukkan derajat kepekaan bakteri tersebut terhadap antibiotik yang bersangkutan (Julius , 1990).

Uji difusi cakram dilakukan hanya sesudah suatu bakteri patogen diasingkan secara murni dari bahan pemeriksaan klinis. Uji kepekaan hanya dilakukan terhadap bakteri patogen dan tidak terhadap bakteri komensal (Julius , 1990).

Jika kita memerlukan hasil uji kepekaan terhadap obat-obatan secara cepat, bahan pemeriksaan klinik langsung ditanamkan secara merata pada permukaan lempeng agar lalu ditemplei cakram antibakteri. Cara ini hanya dilakukan dalam keadaan darurat dan hasilnya harus dikuatkan dengan hasil pemeriksaan dari biakan murni hasil pengasingan. Metode ini dipengaruhi oleh beberapa faktor fisik dan kimia. Selain faktor antara zat antibakteri dan bakteri uji (misalnya sifat medium dan kemampuan difusi, ukuran molekular dan stabilitas obat) (Julius, 1990).

8. Media (Anonim, 1993) :

Media adalah kumpulan zat-zat organik maupun anorganik yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri, maka syarat-syarat media, pembuatan media harus memenuhi dalam :

a. Susunan nutrien

Dalam suatu media yang digunakan haruslah ada: Air, Sumber karbon, Mineral, Vitamin, Gas.

(1). Air : Air untuk pertumbuhan bakteri disamping untuk menjaga kelembaban juga digunakan untuk pertukaran zat (metabolisme). Pada umumnya bakteri peka terhadap kekeringan, kecuali jenis-jenis tertentu dan yang mampu membentuk spora.

(2). Sumber karbon : Sebagai sumber karbon, bakteri dapat menggunakan persenyawaan karbon sederhana misalnya CO_2 dan CH_4 atau persenyawaan karbon yang lebih tinggi misalnya sitrat, tartrat, alkohol atau gula, semua molekul yang mengandung karbon ini terlibat dalam proses metabolisme. Berbagai bakteri mempunyai respon yang berbeda terhadap berbagai macam gula (misalnya : glukosa, laktosa, maltosa, dsb) dan ini dapat dipakai untuk membantu identifikasi bakteri.

(3). Sumber nitrogen : Sebagai sumber nitrogen dapat sebagai unsur nitrogen sendiri atau senyawa-senyawa nitrogen yang sederhana misalnya NO_2 , NO_3 , NH_3 , atau senyawa nitrogen yang lebih tinggi misalnya asam amino, polipeptid, peptid dan pepton, nitrogen diperlukan untuk mensintesis asam amino, nukleotida dan vitamin.

(4). Mineral : Yang penting adalah: Na, k, Mg, Zn, P, S, Na dan Cl dibutuhkan dalam jumlah yang agak besar, terutama digunakan untuk menjaga tetap dalam keadaan isotonis. Mineral diperlukan untuk aktivitas enzim dan molekul yang lain.

(5). Vitamin : Beberapa bakteri membutuhkan vitamin tertentu untuk kehidupannya. Sebagai contoh yang jelas adalah vitamin K yang sangat dibutuhkan oleh *Bacteroides melaninogenicus*.

(6). Gas : Beberapa bakteri memerlukan gas tertentu untuk kehidupannya. Sebagai contoh Gonococcus sangat membutuhkan CO₂ untuk kehidupannya. Namun ada bakteri tertentu yakni bakteri anaerob, adanya oksigen (O₂) akan menghambat pertumbuhan, bahkan membunuhnya.

b. Tekanan osmosis

Tekanan osmosis ialah besarnya tekanan minimum yang diperlukan untuk mencegah aliran air menyeberangi membran didalam larutan. Mengingat sifat-sifat bakteri, juga sama seperti sifat-sifat sel yang lain terhadap tekanan osmose, maka bakteri untuk pertumbuhannya membutuhkan media yang isotonis. Bila media tersebut hipotonis maka bakteri akan mengalami plasmolysis, sedangkan bila media tersebut hipertonis maka akan terjadi plasmolysis.

c. Derajat keasaman

Pada umumnya bakteri membutuhkan pH sekitar netral. Namun pada bakteri tertentu yang membutuhkan pH yang sangat alkalis, yakni Vibrio, yang butuh pH antara 8-10, untuk pertumbuhannya yang optimal. Konsentrasi ion hidrogen (pH) sangat mempengaruhi pertumbuhan bakteri karena nilai pH sangat menentukan aktivitas enzim.

d. Temperatur

Untuk mendapatkan pertumbuhan yang optimal dari bakteri membutuhkan temperatur tertentu. Umumnya untuk bakteri yang patogen membutuhkan temperatur sekitar 37°C, sesuai dengan temperatur tubuh. Namun ada bakteri patogen yang membutuhkan sekitar 42°C yakni *Camphylobacter*. Faktor temperatur merupakan faktor lingkungan terpenting yang mempengaruhi pertumbuhan dan kehidupan bakteri karena enzim yang menjalankan metabolisme sangat peka terhadap temperatur.

e. Sterilitas

Sterilitas media merupakan suatu syarat yang sangat penting. Adalah tidak mungkin kita dapat melakukan pemeriksaan mikrobiologis apabila media yang digunakan tidak steril, karena tidak dapat dibedakan dengan pasti apakah bakteri tersebut berasal dari material yang diperiksa ataukah hanya merupakan kontaminan. Untuk mendapatkan suatu media yang steril maka setiap tindakan (pengambilan media, penuangan media dll) serta alat-alat yang digunakan (tabung, petri dll) haruslah steril dan dikerjakan secara aseptik.

9. Sterilisasi

Sterilisasi merupakan tindakan untuk membebaskan alat/media dari bakteri. Sterilisasi dapat dilakukan secara fisik ataupun kimiawi, secara fisik misalnya dengan panas : (panas kering, panas basah atau panas basah bertekanan), dengan filtrasi, penyinaran dengan radiasi dan secara kimia dengan menggunakan bahan-bahan kimia (fenol dan derivatnya, alkohol, halogen, gas etilen oksida, aldehid) (Anonim, 1994).

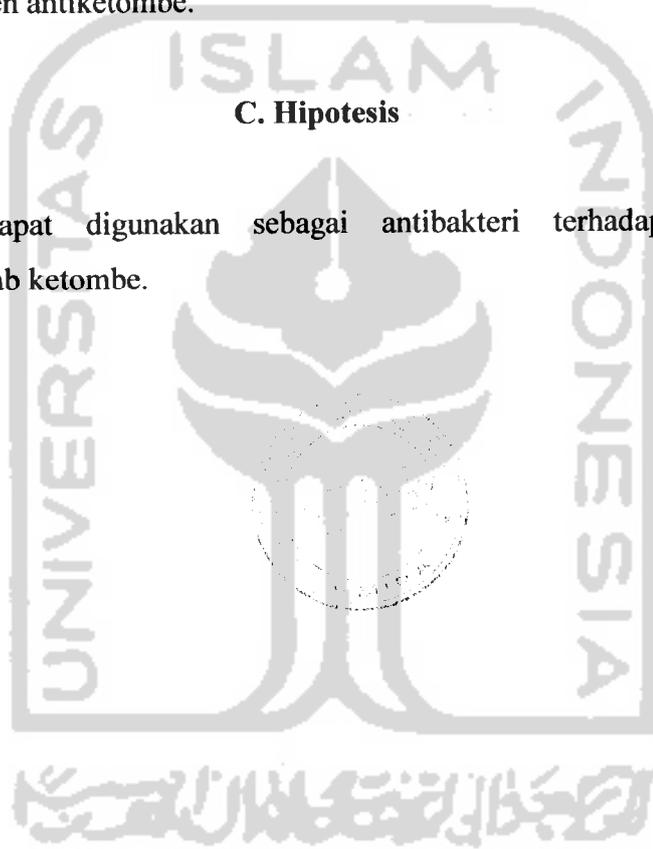
B. Landasan Teori

Potensi udang di Indonesia yang mengalami peningkatan dari tahun – ke tahun menyebabkan penumpukan limbah. Limbah udang ini mengandung konstituen utama yang terdiri dari protein, kalsium karbonat, khitin, pigmen dan abu. Khitin jika diproses lebih lanjut dengan melalui beberapa tahap, akan dihasilkan khitosan. Menurut penelitian yang dilakukan Tsai dan Su khitosan memiliki efek sebagai antibakteri dengan mekanisme kerja meliputi ikatan silang antara polikation dari khitosan dan anion pada permukaan bakteri yang mengubah permeabilitas membran dan menyebabkan kematian bakteri. Ketombe merupakan penyakit yang menyerang kulit kepala, salah satu penyebab penyakit ini adalah bakteri. Kligman dkk. (2005) menyatakan bahwa pada kulit kepala normal jika dibandingkan dengan kulit kepala pasien berketombe maka pada pasien berketombe mikroflora normal mengalami peningkatan. Tiga organisme yang biasanya ditemukan: (1) *Pityrosporum*, (2) *Aerobik coccus*, dan (3) *Corynebacterium acnes*. Salah satu *aerobic coccus* yang dapat menjadi penyebab ketombe adalah *Staphylococcus*

berketombe mikroflora normal mengalami peningkatan. Tiga organisme yang biasanya ditemukan: (1) *Pityrosporum*, (2) Aerobik coccus, dan (3) *Corynebacterium acnes*. Salah satu *aerobic coccus* yang dapat menjadi penyebab ketombe adalah *Staphylococcus epidermidis*, sehingga pada penelitian ini akan sangat menjanjikan jika khitosan mampu digunakan sebagai agen antiketombe, hal ini juga didukung oleh kemampuan khitosan sebagai antiinflamasi sehingga mampu membantu memperbaiki kerusakan yang terjadi pada kulit kepala (Choi dkk., 2003). Dengan demikian akan dapat dibuktikan bahwa efek sebagai antibakteri dari khitosan dapat menjadi salah satu potensi untuk memanfaatkan khitosan sebagai agen antiketombe.

C. Hipotesis

Khitosan dapat digunakan sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus epidermidis* penyebab ketombe.



BAB III

METODE PENELITIAN

Metodologi penelitiannya menggunakan design penelitian eksperimen murni (*true experimental research*). Tahapan penelitiannya di mulai dengan preparasi sampel (*sampling*) mulai dari sampel material sampai media dan alat ujicoba, Pembuatan khitosan, identifikasi *Staphylococcus epidermidis* dari spesimen yang diisolasi di bagian mikrobiologi fakultas kedokteran UGM, dan pengujian khitosan terhadap isolat *Staphylococcus epidermidis* yang dilanjutkan dengan analisis hasil menuju penafsiran dan generalisasi hasil penelitian.

A. Bahan dan alat

1. Bahan : Khitosan yang disintesis sendiri di laboratorium farmasi UII dari cangkang udang yang berasal dari pantura Jawa Timur , *Staphylococcus epidermidis* hasil isolasi kerokan kulit kepala penderita ketombe, Nutrien cair, Nutrien Agar, Agar darah, glukosa cair, Manitol cair, Fruktosa cair, Standar brown (10^8 CFU/ml), Cat Gram A, B, C, D, Aquades yang diperoleh dari laboratorium teknologi sediaan farmasi UII, H_2O_2 3%, HCl 1,25 N yang diperoleh dari laboratorium kimia farmasi UII, NaOH 3,5% dan 60% yang diperoleh dari laboratorium farmakologi farmasi UII, Asam asetat glasial 1% yang diperoleh dari laboratorium kimia farmasi UII, shampoo antiketombe yang mengandung *zinc pyrithione* 1 %.

2. Alat : Otoklaf (memert), inkubator (memert), lemari pendingin, grinder, mikroskop elektrik (NIKON labophot dan Nikon HFX-DX), Laminair air flow (Olipant), oven (memmert), mikropipet, jangka sorong, Timbangan semi analitik, termometer, *colony counter*, kamera digital , petridish, lampu spiritus, pelubang sumuran, ose, *bluetip*, *yellowtip*, ayakan ukuran 40/60 mesh, Alat-alat gelas.

B. Cara Penelitian

1. Pembuatan khitosan (Prasetyo, 2004).

Cangkang udang dicuci dengan air mengalir, dikeringkan di bawah sinar matahari sampai kering, lalu digiling dengan grinder menjadi serbuk, Setelah itu serbuk cangkang udang diayak dengan ayakan ukuran 40/60 mesh. Setelah itu dilanjutkan dengan proses sebagai berikut :

demineralisasi

Serbuk cangkang udang sebanyak 400 gram di demineralisasi dengan cara dipanaskan dengan menggunakan HCl 1,25 N (perbandingan 10: 1) pada suhu 90°C selama 60 menit kemudian dicuci dengan aquades sampai pH netral dan keringkan dalam oven dengan suhu 80°C selama \pm 24 jam.

deproteinisasi

Deproteinisasi dengan dipanaskan menggunakan NaOH 3,5% (perbandingan 6:1) pada suhu 90°C selama 60 menit kemudian dicuci dengan aquades sampai pH netral dan keringkan dalam oven dengan suhu 80°C selama \pm 24 jam, setelah kedua proses ini maka dihasilkan produk yaitu khitin.

Deasetilasi

Khitin yang dihasilkan diproses lebih lanjut menjadi khitosan dengan di deasetilasi yaitu dengan dipanaskan dengan NaOH 60% (perbandingan 20:1) pada suhu 140°C selama 90 menit, kemudian dicuci dengan aquades sampai pH netral dan keringkan dalam oven dengan suhu 70°C selama \pm 24 jam.

Setelah pembuatan khitosan selesai, kemudian untuk mendapatkan khitosan 0,5%; 0,25%; 0,125%; 0,1% dalam 0,1% asam asetat glasial yaitu dengan melarutkan 0,5 gram khitosan dalam 10 ml asam asetat glasial 1% sehingga didapat khitosan dengan kadar 5%, kemudian dari khitosan kadar 5% ini diencerkan 10 kali dengan aquades sehingga kadar khitosan menjadi 0,5%, dari khitosan 0,5% ini diencerkan lagi dengan asam asetat glasial 0,1% sehingga kadar khitosan menjadi 0,25%; 0,125% dan 0,1%.

2. Pembuatan media nutrien cair (Anonim, 1993).

Larutan 13 gram serbuk nutrien cair dalam satu liter aquades campur baik-baik dan aturlah pH \pm 7 dengan menambahkan HCl atau H₂SO₄, kemudian distribusikan dalam tabung percobaan yang diperlukan. Sterilisasi dengan Otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

3. Pembuatan media nutrien agar (Anonim, 1993).

Timbang nutrien serbuk 13 gram larutkan dalam 1 liter aquades, dan aturlah pH \pm 7 dengan menambahkan HCl atau H₂SO₄, Kemudian tambahkan agar sebanyak 1,5%. Distribusikan dalam tabung-tabung percobaan yang diperlukan. Sterilisasi dengan Otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

4. Identifikasi bakteri (Bergey, 2001).

(a). Pewarnaan Gram (Anonim, 1993).

Preparat yang siap dicat digenangi dengan cat Gram A selama 1-3 menit. Disini semua bakteri akan berwarna ungu sesuai dengan warna dari cat Gram A. Kemudian cat dibuang dan tanpa dicuci. Kemudian digenangi dengan cat Gram B selama ½-1 menit. Akibat dari pemberian Gram B maka pengikatan warna oleh bakteri menjadi lebih baik. Setelah itu cat dibuang dan preparat dicuci dengan air ledeng. Kemudian dicelup cat Gram C sampai warna cat tepat dilunturkan. Setelah pemberian cat Gram C maka akan terjadi : bakteri Gram positif tahan terhadap alkohol (ikatan antara cat dengan bakteri tidak dilunturkan oleh alkohol) sehingga bakteri akan tetap berwarna ungu, bakteri Gram negatif tidak tahan terhadap alkohol, sehingga warna ungu dari cat dilunturkan dan bakteri menjadi tidak berwarna lagi. Setelah itu digenangi dengan cat Gram D selama 1-2 menit. Gram D bertindak sebagai warna kontras. Akibat dari pemberian Gram D maka : Bakteri Gram positif oleh karena telah jenuh mengikat cat Gram A maka ia tidak mampu lagi untuk mengikat Gram D sehingga bakteri akan tetap berwarna ungu, Bakteri Gram negatif oleh karena warna cat sebelumnya dilunturkan oleh cat Gram C sehingga bakteri

menjadi tidak berwarna maka ia mengikat warna cat Gram D sehingga bakteri menjadi berwarna merah. Setelah itu preparat dicuci dan dikeringkan dalam udara kamar (dengan preparat dalam posisi miring) dan setelah itu diperiksa dibawah mikroskop dengan menggunakan perbesaran kuat.

(b). Uji katalase (Anonim, 1993).

Bakteri diambil dari biakan padat dengan menggunakan ose steril pada sebuah preparat dibuat suspensi pekat bakteri tersebut dalam air. Tambahkan satu tetes reagen 3 % H₂O₂ , goyangkan supaya bercampur dan periksa pembentukan gas atau dengan cara menuangkan 1 ml reagen diatas permukaan kultur pada agar miring umur 24 jam, dan letakkan tabung pada posisi miring dan 1 tetes diatas media agar miring sebagai pembanding. Hasil uji :

Positif : segera timbul gelembung-gelembung gas O₂

Negatif : tidak timbul gelembung gas

(c). Uji fermentasi glukosa (Anonim, 1993).

Uji ini digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menggunakan satu jenis karbohidrat sebagai sumber karbon. Uji dilakukan dengan cara satu koloni bakteri diinokulasikan pada glukosa cair dengan tabung reaksi yang dilengkapi dengan tabung durham untuk menangkap gas yang keluar. Kemudian diinkubasikan pada 35 °C dan diperiksa setelah 2 hari. Tes dinyatakan positif bila terjadi perubahan warna menjadi kuning pada media glukosa cair, dan bakteri memfermentasi glukosa dengan kuat bila timbul gelembung gas. Tes dinyatakan negatif bila warna media glukosa cair tetap merah.

(d) Uji fermentasi manitol (Anonim, 1993).

Satu koloni bakteri diinokulasikan pada agar manitol dengan menusukkan kebawah dasar tabung. Kemudian diinkubasikan pada 35 °C dan diperiksa setelah 2 hari. Tes dinyatakan positif bila terjadi perubahan warna menjadi kuning pada bagian atas dan bawah tabung. Pemeriksaan ini dapat juga dikerjakan dengan manitol cair dengan tabung reaksi yang dilengkapi dengan tabung durham untuk menangkap gas yang keluar. Kemudian diinkubasi pada 35°C dan diperiksa setelah 2 hari. Bila media manitol cair berwarna kuning cerah berarti *Staphylococcus aureus*. Tetapi bila media manitol cair tetap berwarna merah atau ungu, berarti *Staphylococcus* dengan koagulase negatif, misalnya *Staphylococcus epidermidis*.

(e) Uji fermentasi fruktosa (Anonim, 1993).

Uji ini digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menggunakan satu jenis karbohidrat sebagai sumber karbon. Uji dilakukan dengan cara satu koloni bakteri diinokulasikan pada fruktosa cair dengan tabung reaksi yang dilengkapi dengan tabung durham untuk menangkap gas yang keluar. Kemudian diinkubasikan pada 35 °C dan diperiksa setelah 2 hari. Tes dinyatakan positif bila terjadi perubahan warna menjadi kuning pada media fruktosa cair, dan bakteri memfermentasi fruktosa dengan kuat bila timbul gelembung gas. Tes dinyatakan negatif bila warna media fruktosa cair tetap merah.

5. Pembuatan inokulum bakteri (Anonim, 1993).

Isolat bakteri diambil dengan ose dan diinokulasikan pada media nutrien cair sebanyak 5 ml di dalam tabung reaksi, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 – 48 jam. Setelah 24 jam isolat bakteri diambil dengan ose dan diinokulasikan pada media nutrien cair sebanyak 5 ml di dalam tabung reaksi, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 – 48 jam kemudian suspensi bakteri diencerkan dengan aquades steril sehingga kekeruhannya sesuai standar Brown (10^8 CFU/ml).

6. Uji daya antibakteri dari khitosan terhadap *Staphylococcus epidermidis* (Julius , 1990).

Daya hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus epidermidis* dari khitosan, dilakukan dengan metode difusi padat untuk mengukur diameter zona hambat, meliputi sterilisasi alat dan bahan, pembuatan stok bakteri, pembuatan media, penanaman bakteri uji dan uji aktivitas dengan metode difusi padat cara sumuran dalam media nutrien agar. Uji aktivitas dengan metode difusi padat cara sumuran masing-masing dilakukan dengan 6 kelompok, Kelompok 1 (pembanding negatif) dengan pelarut khitosan yaitu asam asetat glasial 0,1 %, Kelompok 2 untuk pembanding positif berupa shampo antiketombe yang mengandung zink 1%, Untuk kelompok 3-6 bakteri uji ditambah khitosan dengan kadar 0,5%, 0,25%, 0,125%, 1%. Kultur yang telah diberi perlakuan kemudian diinkubasi

selama 24 jam pada 37°C. Aktivitas khitosan terhadap *Staphylococcus epidermidis* dihitung diameter zona hambatannya. Selain itu juga dilakukan uji penghambatan khitosan terhadap *Staphylococcus epidermidis* dalam media nutrisi cair, media nutrisi cair ditambah suspensi bakteri uji 10^8 CFU/ml kemudian ditambah khitosan yang dibuat pengenceran dengan kadar 0,5%, 0,25%, 0,125%, 1% kemudian inkubasi 37°C selama 24 jam, amati kekeruhan dan tentukan kadar hambat minimal. Disini digunakan perbandingan berupa perlakuan nutrisi cair ditambah dengan bakteri uji dan shampoo yang mengandung zink 1%, nutrisi cair ditambah bakteri uji dan asam asetat glasial 0,1 %, nutrisi cair dengan bakteri uji, dan nutrisi cair saja. Untuk mempertegas hasil maka dilakukan uji penghambatan khitosan 0,5% terhadap *Staphylococcus epidermidis* dalam media nutrisi cair dan pada waktu-waktu tertentu (0, 1, 2, 3, 6, 24, 27, 30, 72, 75 jam) diambil dan ditanam secara taburan pada media nutrisi agar kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan dihitung jumlah bakteri yang tumbuh. Dari data ini kita dapat menghitung nilai k, g dan μ .

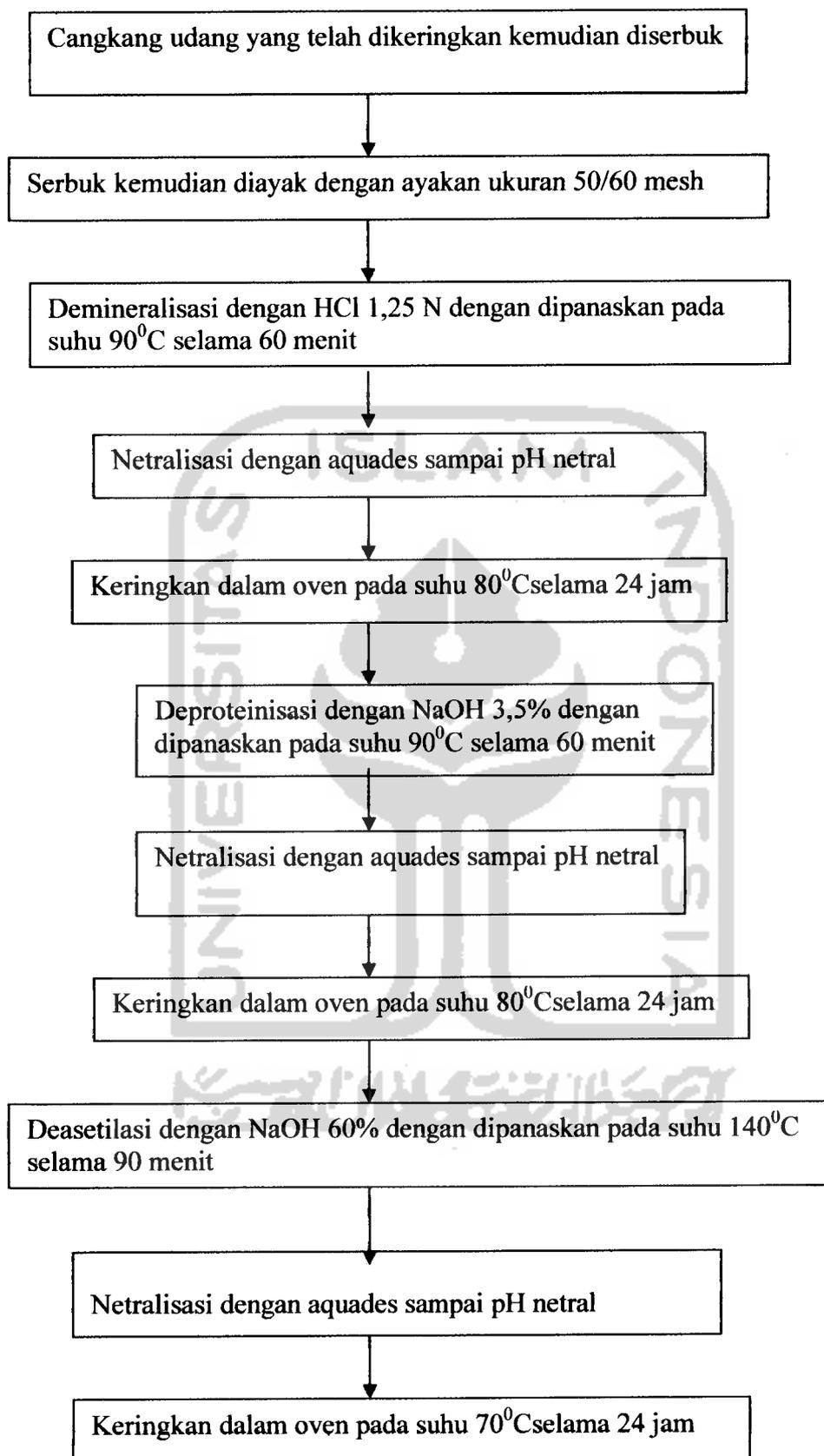
(a) Difusi padat Cara Sumuran dalam media nutrisi agar

Diambil beberapa koloni bakteri dari pertumbuhan 24 jam pada nutrisi agar, disuspensikan kedalam 0.5 ml media nutrisi cair, diinkubasikan 5-8 jam pada 37°C. Suspensi tersebut ditambah aquades steril hingga kekeruhan tertentu sesuai dengan standar Brown, kemudian tuang suspensi bakteri yang telah sesuai standar tersebut kedalam media nutrisi agar. Tunggulah sebentar sampai agar tersebut membeku. Pada agar tersebut dibuat sumuran dengan garis tengah 6 mm. Kedalam sumuran tersebut diteteskan larutan khitosan dengan kadar 0,5%, 0,25%, 0,125%, 1%, inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

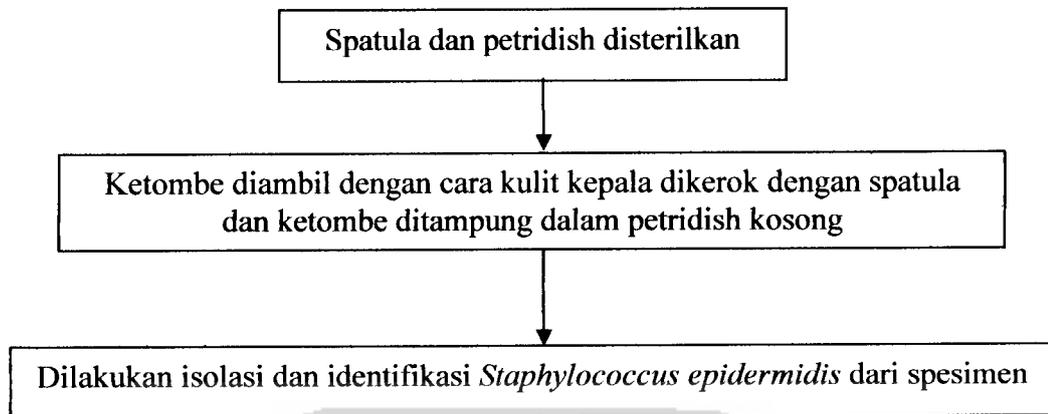
Dibaca hasilnya:

a Zone radikal: Suatu daerah disekitar dish dimana sama sekali tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri.

b Zone irradikal: Suatu daerah disekitar dish menunjukkan pertumbuhan bakteri di hambat oleh zat antibakteri, tetapi tidak dimatikan. Disini akan terlihat adanya pertumbuhan yang kurang subur/lebih jarang dibanding dengan daerah diluar pengaruh antibakteri tersebut

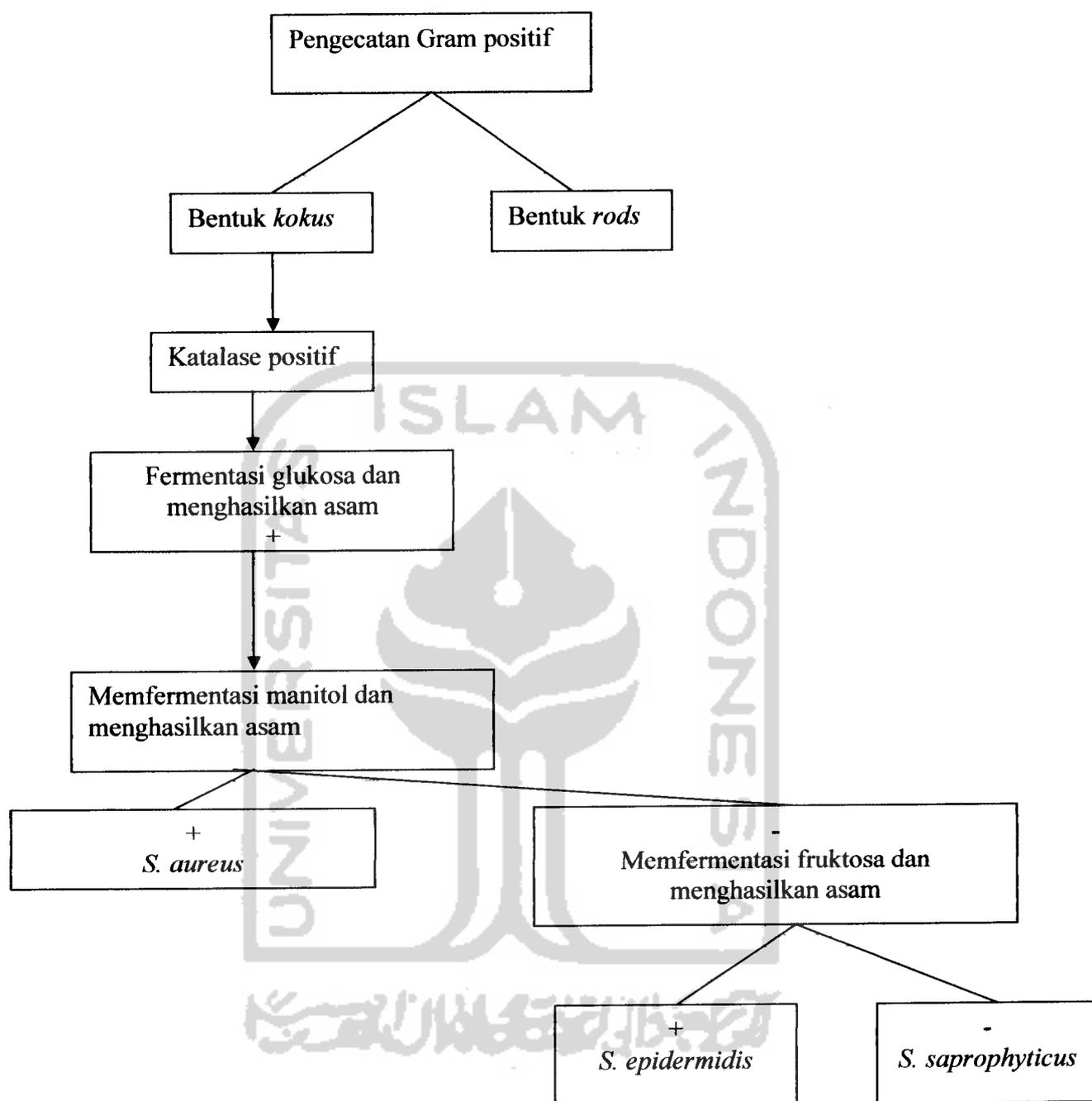


Gambar 4. Skema pembuatan khitosan.

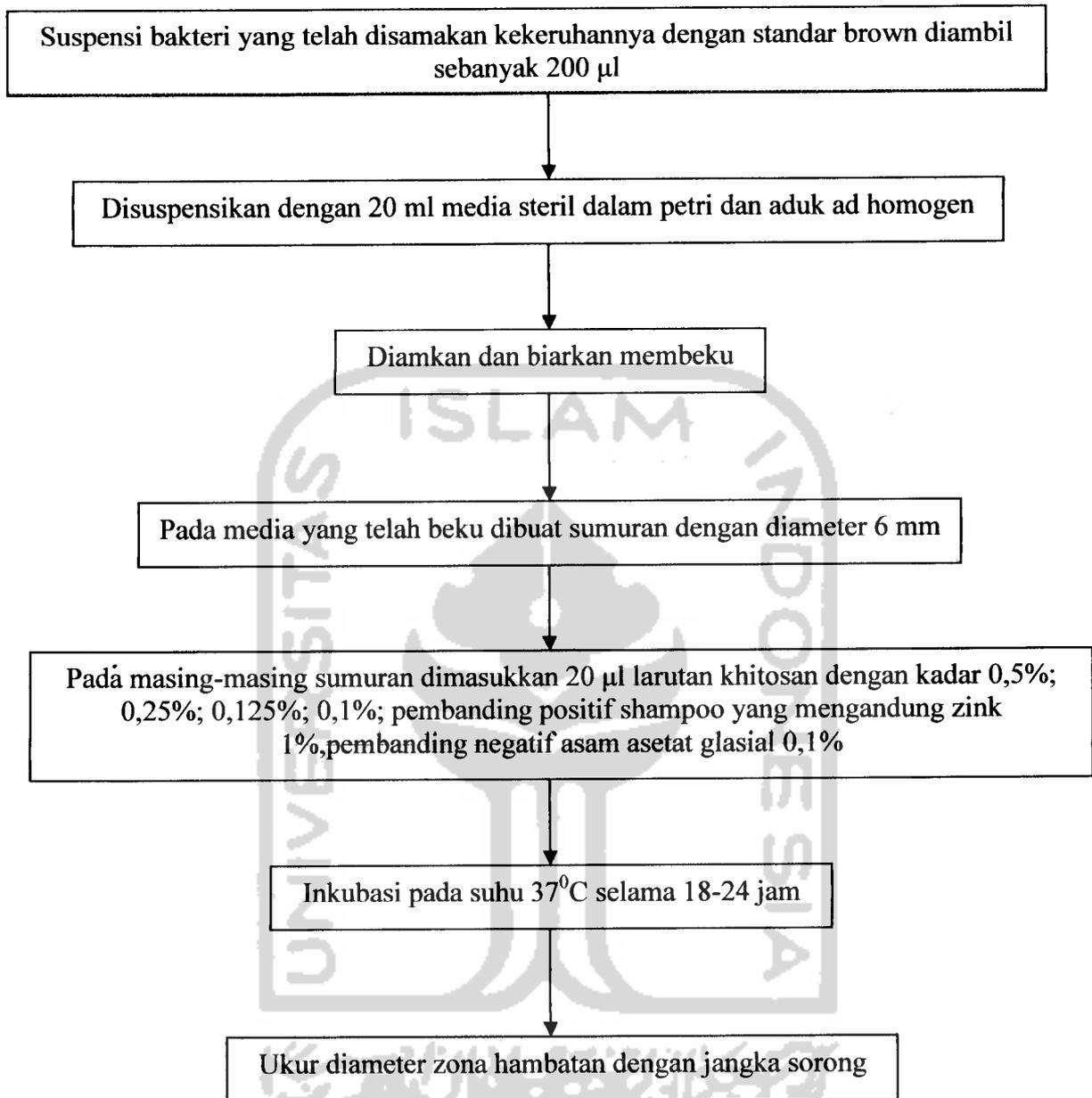


Gambar 5. Skema pengambilan spesimen.

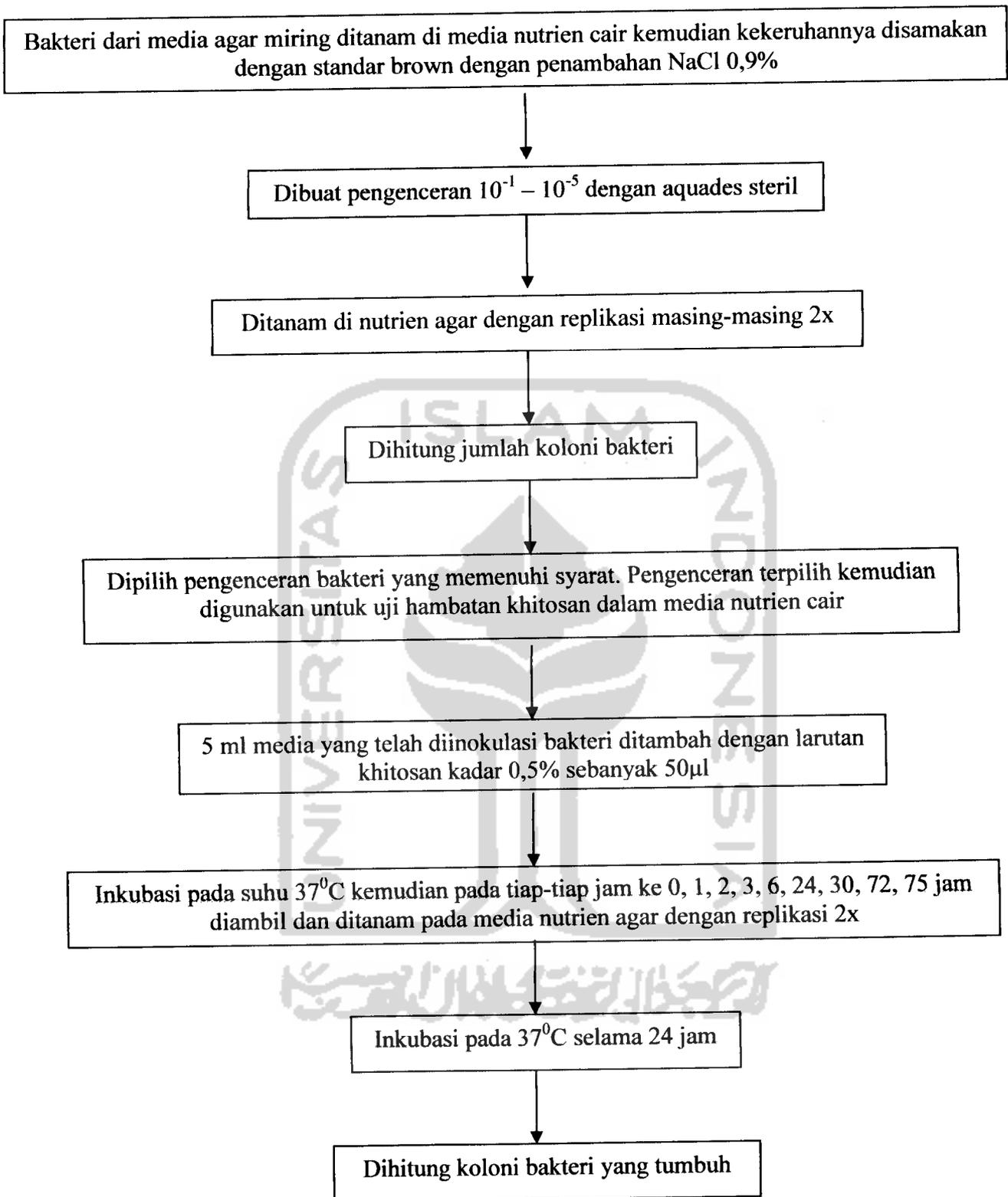




Gambar 6. Skema identifikasi *Staphylococcus epidermidis*.



Gambar 7. Skema uji pengaruh khitosan terhadap *Staphylococcus epidermidis* dengan metode difusi padat cara sumuran dalam media nutrisi agar.



Gambar 8. Skema uji pengaruh khitosan terhadap *Staphylococcus epidermidis* dalam media nutrisi cair.

C. Analisis Hasil

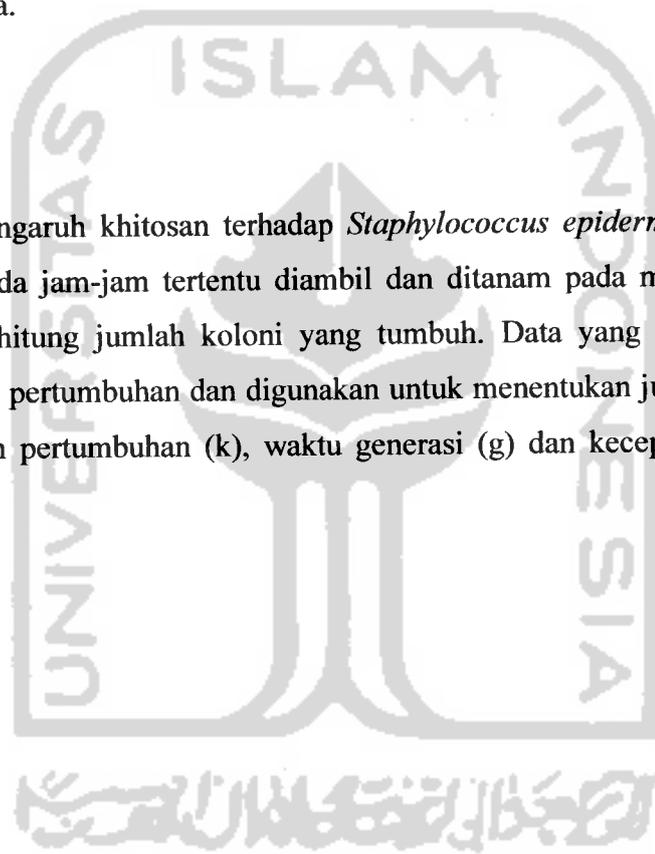
1. Kualitatif

Hasil uji aktivitas mikrobiologi berupa diameter zona hambatan dibuat rata-ratanya dan dilakukan analisis variansi satu jalan antar kelompok perlakuan. Jika terjadi perbedaan yang bermakna dilanjutkan dengan uji tukey.

Hasil uji pengaruh khitosan terhadap *Staphylococcus epidermidis* dalam media cair yaitu dilihat kekeruhannya.

2. Kuantitatif

Hasil uji pengaruh khitosan terhadap *Staphylococcus epidermidis* dalam media nutrien cair dan pada jam-jam tertentu diambil dan ditanam pada media nutrien agar, setelah inkubasi dihitung jumlah koloni yang tumbuh. Data yang diperoleh dikemas dalam bentuk kurva pertumbuhan dan digunakan untuk menentukan jumlah generasi (n), konstanta kecepatan pertumbuhan (k), waktu generasi (g) dan kecepatan pertumbuhan secara praktis (μ).



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

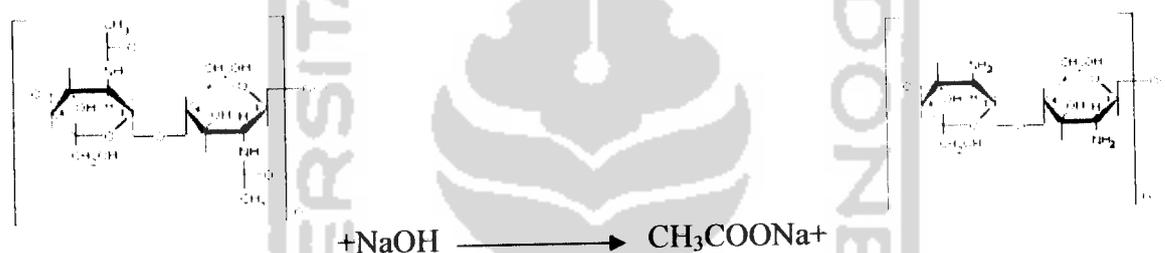
1. Isolasi khitin dari cangkang udang dan sintesisnya menjadi khitosan

Sebelum mengisolasi khitin dari cangkang udang, cangkang udang dicuci dengan air mengalir, dikeringkan di bawah sinar matahari sampai kering, lalu digiling dengan grinder menjadi serbuk, karena pada cangkang udang protein dan mineral tidak hanya terdapat pada permukaan cangkang, namun juga terdapat dalam pori-pori cangkang, dan khitin biasanya terdapat bersama-sama dengan protein atau polisakarida lain. Dalam bentuk serbuk maka proses deasetilasi dan deproteinasi lebih efektif karena serbuk memiliki luas permukaan yang lebih besar untuk berinteraksi dengan bahan kimia yang digunakan dalam proses deasetilasi dan deproteinasi. Setelah itu serbuk cangkang udang diayak dengan ayakan dengan ukuran 40/60 mesh, agar ukurannya homogen.

Proses demineralisasi dilakukan dengan menggunakan asam klorida 1,25 N dengan perbandingan 10:1 untuk pelarut dibanding cangkang udang, lalu dipanaskan pada suhu 90°C selama satu jam, pemanasan bertujuan untuk membantu mempercepat proses pelepasan mineral. Proses ini untuk mengikat, memutus dan melepaskan mineral dengan reaksi destruksi asam, asam klorida dipilih karena tidak menghasilkan residu, mineral yang cenderung bersifat basa direaksikan dengan asam klorida sehingga terbentuk garam yang larut air. Residu berupa padatan dicuci dengan aquades sampai pH netral dan selanjutnya dikeringkan dalam oven pada suhu 80°C selama 24 jam.

Proses Deproteinisasi dilakukan dengan menggunakan larutan sodium hidroksida 3,5 persen dengan perbandingan antara pelarut dan cangkang udang 6:1. Selanjutnya dipanaskan pada suhu 90°C selama satu jam, pemanasan bertujuan untuk membantu mempercepat proses pelepasan protein. Dalam proses ini digunakan larutan sodium hidroksida 3,5 persen karena protein yang bersifat organik dapat larut dalam larutan sodium hidroksida yang bersifat anorganik. Kemudian larutan disaring dan didinginkan sehingga diperoleh residu padatan yang kemudian dicuci dengan aquades sampai pH netral dan dikeringkan pada suhu 80°C selama 24 jam. Setelah kedua proses ini maka dihasilkan produk berupa khitin.

Deasetilasi khitin menjadi khitosan dilakukan dengan menambahkan sodium hidroksida 60% dengan perbandingan pelarut dibanding khitin 20:1, lalu dipanaskan selama 90 menit dengan suhu 140°C, pemanasan pada suhu ini digunakan untuk mengoptimalkan proses pemutusan gugus asetil. Pada proses ini digunakan Larutan sodium hidroksida dengan kadar yang lebih tinggi yaitu 60% karena ikatan gugus asetil meningkatkan ikatan hidrogen sehingga ikatannya cukup kuat jadi pemutusan ikatannya cukup sulit, sehingga membutuhkan sodium hidroksida yang lebih pekat. Kemudian disaring untuk mendapatkan residu berupa padatan, lalu dilakukan pencucian dengan aquades sampai pH netral, kemudian dikeringkan dengan oven suhu 70°C selama 24 jam. Pada penelitian yang dilakukan didapatkan khitosan sebesar 3% dari berat kering cangkang udang. Pemutusan gugus asetil oleh sodium hidroksida terjadi melalui reaksi sebagai berikut :



Gambar 11. Reaksi pemutusan gugus asetil pada khitin oleh NaOH (Anonim, 2005).

Khitin bersifat inert, banyak gugus asetil sebagai gugus penyeimbang/rantai khitin antara satu dengan yang lainnya berasosiasi dengan ikatan hidrogen yang sangat kuat antara gugus N-H dari satu rantai dan gugus C=O dari rantai yang berdekatan, ikatan hidrogen menyebabkan khitin tidak dapat larut dalam air dan membentuk formasi serabut. khitin sukar larut dalam air dan asam-asam organik lemah, sedangkan khitosan dapat larut dalam asam-asam organik lemah dan dalam asam asetat dapat larut dengan baik, Khitosan mudah larut dalam asam sebagai efek penggaraman gugus fungsi amino. Sehingga pada penelitian ini asam asetat glasial dipilih sebagai pelarut, walaupun asam asetat glasial memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus epidermidis*, hal ini diatasi dengan cara mengencerkan asam asetat glasial yang digunakan. Pada asam asetat glasial dilakukan pengenceran dari 10^{-1} - 10^{-5} setelah itu dilakukan uji aktivitas asam asetat glasial dari berbagai pengenceran terhadap *Staphylococcus epidermidis*, dari uji ini didapatkan hasil pada pengenceran 10^{-1} - 10^{-3} asam asetat glasial masih memiliki aktivitas

antibakteri, walaupun pada pengenceran 10^{-3} aktivitasnya hanya kecil, sedangkan pengenceran 10^{-4} - 10^{-5} tidak memiliki aktivitas antibakteri. Pada penelitian ini khitosan yang dihasilkan dapat dilarutkan oleh asam asetat glasial pengenceran 10^{-2} . Setelah dilarutkan dalam asam asetat glasial pengenceran 10^{-2} kadar terbesar yang dapat dilarutkan adalah 5%, namun karena asam asetat glasial pengenceran 10^{-2} masih memiliki aktivitas antibakteri yang cukup besar terhadap *Staphylococcus epidermidis* maka khitosan yang telah dilarutkan kita encerkan dengan aquades 10x, sehingga kadar khitosan menjadi 0,5%, kemudian dari khitosan 0,5% dibuat seri kadar 0,25%; 0,125%; dan 0,1% dengan menambahkan asam asetat glasial 0,1%.

Tabel I. Keasaman asam asetat glasial dari berbagai pengenceran

Pengenceran	pH
10^0	1,0
10^{-1}	2,0
10^{-2}	2,5
10^{-3}	3,0
10^{-4}	3,5
10^{-5}	4,5
10^{-6}	6,0

Tabel II. Hasil uji aktivitas pelarut (asam asetat glasial) terhadap *Staphylococcus epidermidis* dengan metode difusi padat cara sumuran dalam media nutrisi agar

Pengenceran	Replikasi 1(mm)	Replikasi 2 (mm)	Replikasi 3 (mm)
10^{-1}	20	18	18
10^{-2}	12	13	11
10^{-3}	7	7	7
10^{-4}	6	6	6
10^{-5}	6	6	6

Ket : Diameter zona hambatan termasuk diameter pelubang sumuran (6 mm).

2. Identifikasi *Staphylococcus epidermidis*

Pada uji ini *Staphylococcus epidermidis* yang kita gunakan diisolasi langsung dari kulit kepala pasien yang menderita ketombe dan belum mendapatkan pengobatan agar tidak terjadi resistensi pada bakteri tersebut, selain itu bakteri yang dibeli kemungkinan

Tabel III. Sifat morfologi dan biokimiawi *Staphylococcus epidermidis*

UJI	HASIL
MORFOLOGI	
pengecatan Gram	+
Bentuk koloni	
Susunan koloni	Tunggal, berpasangan, seperti buah anggur
Warna koloni	Putih
Pertumbuhan pada agar darah	
Warna koloni	putih
hemolisa	-
Pertumbuhan pada nutrien cair	
Kebutuhan oksigen	Anaerob fakultatif
SIFAT BIOKIMIAWI	
katalase	+
Fermentasi glukosa	+
Fermentasi manitol	-
Fermentasi fruktosa	+

3. Uji mikrobiologi

a. Uji pengaruh khitosan terhadap *Staphylococcus epidermidis* dengan metode difusi padat cara sumuran dalam media nutrien agar

Metode difusi padat cara sumuran dipilih karena kita ingin mengetahui perbandingan diameter zona hambatan dari setiap seri kadar khitosan yang kita gunakan, disini kita menggunakan pembanding positif yaitu shampoo yang beredar dipasaran yang mengandung zink 1% dan pembanding negatif yaitu asam asetat glasial pengenceran 10^{-3} (pelarut). Pembanding negatif (pelarut) yang digunakan adalah untuk mengetahui apakah pelarut yang digunakan mempunyai aktivitas antibakteri, sedangkan pembanding positif digunakan sebagai pembanding daya antibakteri terhadap salah satu bakteri penyebab ketombe (*Staphylococcus epidermidis*). Pada penelitian ini volume khitosan yang diambil adalah 20 μ L.

Dari uji dengan metode ini didapatkan hasil bahwa khitosan dengan kadar 0,5%; 0,25%; 0,125% ; dan 1% tidak memberikan diameter zona hambat terhadap

Staphylococcus epidermidis. Sedangkan pembanding positif dan pembanding negatif memberikan diameter zona hambat.

Tabel IV. Pengaruh khitosan terhadap *Staphylococcus epidermidis* dengan metode difusi padat cara sumuran dalam media nutrien agar.

Perlakuan	Replikasi 1(mm)			Replikasi 2(mm)			Replikasi 3(mm)			Rata-rata ± standar deviasi
Pembanding +	24	24	24	24	24	25	24	24	24	24,11 ± 0,19
Pembanding -	7	7	6	8	8	7	7	7	8	7,22 ± 0,51
Khitosan 0,5%	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6,00±0,00
Khitosan 0,25%	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6,00±0,00
Khitosan 0,125%	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6,00±0,00
Khitosan 1%	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6,00±0,00

Ket :

Diameter zona hambatan termasuk diameter pelubang sumuran (6 mm).

Semua perlakuan diinokulasi *Staphylococcus epidermidis*

Pembanding + : shampoo yang mengandung zink 1%

Pembanding - : asam asetat glasial 0,1%

b. Uji pengaruh khitosan terhadap *Staphylococcus epidermidis* dalam media nutrien cair

Karena pada uji dengan metode difusi padat tidak ada diameter zona hambatan maka hasilnya dipertegas lagi dengan uji dengan menggunakan media nutrien cair. Pada uji ini digunakan pembanding nutrien cair + asam asetat glasial 0,1% + *Staphylococcus epidermidis*, nutrien cair + shampo zink 1% + *Staphylococcus epidermidis*, nutrien cair + *Staphylococcus epidermidis*, media nutrien cair saja. Pembanding media + suspensi bakteri untuk mengetahui ada tidaknya pertumbuhan bakteri, pembanding media + pelarut + bakteri untuk mengetahui apakah pelarut yang digunakan memiliki aktivitas antibakteri agar tidak mempengaruhi hasil sedangkan pembanding media saja adalah untuk mengetahui sterilitas media yang digunakan pada uji dan pembanding media + shampo zink + bakteri adalah sebagai pembanding aktivitas antibakteri dari khitosan, disini pembanding positif yang kita gunakan adalah shampoo karena tujuan akhir dari penelitian ini adalah penggunaan khitosan sebagai agen antiketombe.

Tabel V. Penghambatan *Staphylococcus epidermidis* oleh khitosan dalam media nutrien cair.

PERLAKUAN	PERTUMBUHAN <i>S. epidermidis</i>		
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3
A	++	++	++
B	++	++	++
C	++	++	++
D	++	+	++
E	+	+	+
F	*	*	*
G	++	++	++
H	-	-	-

Ket:

++ : keruh sekali (ada pertumbuhan bakteri)

+ : keruh (ada pertumbuhan bakteri)

* : keruh (karena bahannya, bukan karena adanya pertumbuhan bakteri)

- : jernih (tidak ada pertumbuhan bakteri)

A : Nutrien cair + khitosan 0,5% + *Staphylococcus epidermidis*

B : Nutrien cair + khitosan 0,25% + *Staphylococcus epidermidis*

C : Nutrien cair + khitosan 0,125% + *Staphylococcus epidermidis*

D : Nutrien cair + khitosan 0,1% + *Staphylococcus epidermidis*

E : Nutrien cair + Asam Asetat Glisial 0,1% + *Staphylococcus epidermidis*

F : Nutrien cair + shampoo zink 1% + *Staphylococcus epidermidis*

G : Nutrien cair + *Staphylococcus epidermidis*

H : Nutrien cair

Setelah dilakukan uji pengaruh khitosan terhadap *Staphylococcus epidermidis* dalam media nutrien cair diperoleh hasil bahwa perlakuan dengan khitosan (A-D) semuanya masih ditumbuhi oleh bakteri sehingga dilanjutkan uji penghambatan *Staphylococcus epidermidis* oleh khitosan 0,5% dalam media nutrien cair dan pada waktu-waktu tertentu (jam ke 0, 1, 2, 3, 6, 24, 27, 30, 72, 75) di ambil dan ditanam secara taburan pada media nutrien agar. Setelah inkubasi pada 37°C selama 24 jam koloni bakteri yang tumbuh dihitung. Uji dilakukan dengan menggunakan metode taburan karena kita ingin menghitung jumlah bakteri yang hidup saja, sehingga jika khitosan mampu menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri maka jumlah koloni bakteri yang tumbuh semakin sedikit, sedangkan jika menggunakan cara turbidimetri maka yang dihitung adalah bakteri secara keseluruhan baik yang hidup maupun yang mati.

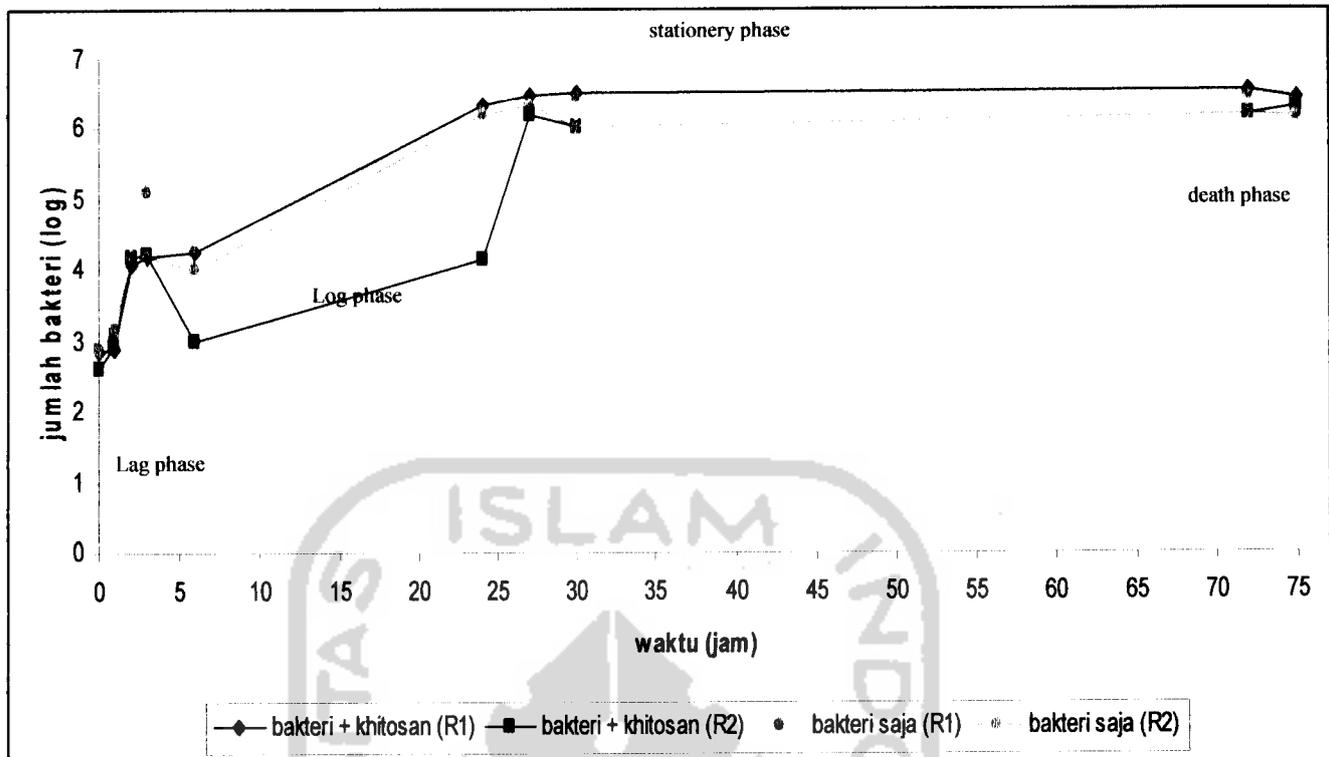
Tabel VI. Penghambatan *Staphylococcus epidermidis* oleh khitosan 0,5%. dalam media nutrisi cair kemudian ditanam secara taburan pada media nutrisi agar.

Waktu (Jam)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> + khitosan 0,5%. (Jumlah bakteria dalam log).		(Pembandingan) <i>Staphylococcus epidermidis</i> . (Jumlah bakteria dalam log).	
	R1	R2	R1	R2
0	2,84	2,60	2,87	2,85
1	2,87	2,91	3,11	3,18
2	4,08	4,18	4,18	4,18
3	4,18	4,21	5,10	4,18
6	4,26	3,00	4,27	4,00
24	6,33	4,16	6,27	6,20
27	6,48	6,19	6,34	6,32
30	6,49	6,02	6,43	6,01
72	6,54	6,20	6,48	6,19
75	6,43	6,31	6,41	6,17

Data yang diperolehi dikemas dalam bentuk kurva pertumbuhan dan digunakan untuk menentukan waktu generasi (g), kecekapan pertumbuhan secara teoritis (k) dan kecekapan pertumbuhan secara praktikal (μ).

Tabel VII. Kinetika pertumbuhan isolat pada media nutrisi cair dengan khitosan 0,5%.

Isolat	Media ditambah	μ		k		H (jam ⁻¹)		g (jam)	
		R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
<i>S. epidermidis</i>	khitosan	12,29	12,325	0,17	0,164	0,12	0,113	5,88	6,097
<i>S. epidermidis</i>	-	11,99	11,528	0,17	0,426	0,12	0,295	5,88	2,347



Gambar 9. Kurva pertumbuhan *Staphylococcus epidermidis* dengan khitosan 0,5% dalam media nutrisi cair kemudian ditanam secara taburan pada media nutrisi agar .

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada uji dengan metode difusi padat cara sumuran tidak terlihat adanya diameter zona hambatan, begitu pula uji pada media nutrisi cair, tidak ada hambatan pertumbuhan bakteri oleh khitosan yang ditunjukkan oleh kekeruhan media, dan setelah diuji dalam medium nutrisi cair dan ditanam secara taburan pada media nutrisi agar kemudian diinkubasi pada 37°C selama 24 jam dan dihitung koloni bakteri yang tumbuh, dari data ini kemudian dikemas dalam bentuk kurva pertumbuhan dan digunakan untuk menentukan nilai k , g dan μ . Dari hasil ini dapat disimpulkan bahwa khitosan belum dapat memberikan hambatan terhadap pertumbuhan *Staphylococcus epidermidis*, ini dilihat dari waktu generasi dan nilai μ perlakuan dengan khitosan yang hampir sama dibandingkan perlakuan tanpa khitosan. Namun jika waktu generasi dibandingkan dengan literatur (44-98 menit) maka hasil penelitian menunjukkan waktu generasi yang lebih lama, hal ini kemungkinan disebabkan oleh faktor lingkungan yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri yaitu meliputi : pH medium, tekanan osmosis,

temperatur, nutrien, kelembaban dan tegangan permukaan, sehingga pertumbuhan bakteri menjadi terhambat dan waktu generasi menjadi lebih lama.

Dari hasil ini diperkirakan derajat deasetilasi dari khitosan belum masuk kualitas *pharmaceutical grade*, walaupun proses pembuatannya telah melalui prosedur yang sesuai, sehingga aktivitas antibakterinya belum terlihat.



- Khan, Tanveer Ahmad., Peh, Kok Kiang., Ch'ng, Hung Seng., 2000, Mechanical Bioadhesive Strength and Biological Evaluations of Chitosan film for Wound Dressing, *J.Pharm., School of Pharmaceutical Sciences*, University of Science Malaysia, 11800 Penang, Malaysia.
- Kligman et al., 2005, *Quantitative Microbiology of the Scalp in non dandruff, dandruff and Seborrheic dermatitis*, available at <http://www.Medline.com> (diakses 20 November 2005).
- Knaul. J. Z., Hudson SM and Creber KAM, 1999, Improved mechanical properties of chitosan fibers, *J. Appl polym Sci* 72 : 1721-1732.
- Kurita k., 1998, *Chemistry and application of chitin and chitosan*, *polym degrad stabil*; 59: 17-20
- Lorian, V., 1980, *Antibiotic In Laboratory Medicine*, Waverly, Press. Inc, Mt. Royal and Guilford Aves, Baltimore, USA.
- Manjang, Y., 1993, Analisa Ekstrak Berbagai Jenis Kulit Udang Terhadap Mutu Khitosan, *Jurnal Penelitian Andalas*. 12 (V) : 138 – 143.
- Marganof, 2003, *Potensi Limbah Udang sebagai Penyerap Logam Berat (timbal, kadmium dan tembaga) di Perairan*, Makalah Pengantar Falsafah Sains (PPS702), Program Pasca Sarjana / S3, Institut Pertanian Bogor.
- Muzzarelli, R.A.A., 1986, *Chitin*, Faculty of Medicine University of Ancona, Italy, Pergamon Press. 81 –87.
- Neely, M.C.H and William, 1969, *Chitin and Its Derivates in Industrial*, Gums Kelco Company California. 193 – 212.
- Nweze, E. I., 2001, Etiology of Dermatophytoses Amongst Children in Northeastern Nigeria, *Med Mycol*. 39:181-184.
- No, H. K., N. Y. Park, S. H. Lee, dan S. P. Meyers, 2002, Antibacterial activity of chitosan and chitosan oligomers with different molecular weight, *J. Food micribiol.*, 74(1-2) : 65-72.
- Ohlendorf, H.M., 1996, *Selenium, in Fairbrother, A., (ed)., Noninfectious Diseases of Wildlife* (2nd ed.): Ames, Iowa, Iowa State University Press, p. 128–140.
- Okawa Y, Kobayashi M, Suzuki, S, and Suzuki, M., 2003, Comparative Study of Protective Effects of Chitin, Chitosan, and N-Acetyl Chitohexaose against *Pseudomonas aeruginosa* and *Listeria monocytogenes* Infections in Mice, *Biol. Pharm. Bull.* 26(6) 902-904.
- Pelczar, M.J., dan Chan, E.C.S., 2000, *Dasar-Dasar Mikrobiologi*, diterjemahkan oleh Ratna Sri Hadioetomo, jilid 11, UI Press, jakarta.
- Prasetyo, K.W., 2004, *Pemanfaatan Limbah Cangkang Udang sebagai Bahan Pengawet Kayu Ramah Lingkungan*, S Hut UPT Balitbang Biomaterial LIPI Cibinong, Bogor.
- Pujiastuti, 2004, Upaya Sintesis Kitosan Sebagai Pharmaceutical Grade Melalui Proses Biotransformasi Kitin, *Jurnal Farmasi Indonesia* Vol 1 No 3:127,128,129,133.
- Squeo, R. F., R. Beer, D. Silvers, I. Weitzman, and M. Grossman, 1998, Invasive *Trichophyton Rubrum* Resembling Blastomycosis Infection in the Immunocompromised Host, *J Am Acad Dermatol*, 39:379-80.
- Stice, A., 2005, *Dandruff*, <http://www.medical-advisor.org/Dandruff.php> (diakses 14 November 2005).

- Tsai, C. J. Hsu, L. R. Fang, J. Y. Dan Lin, H. H., 1999, Chitosan Hydrogel as a Base Transdermal Delivery of Barberine and its Evaluation in Rat Skin, *Biol pharmBull.*, 22 (4): 397
- Wasitaatmadja, S.M., 1997, *Penuntun Ilmu Kosmetik Medik*, Penerbit Universitas Indonesia (UI-PRESS), Jakarta, hal. 209.



LAMPIRAN

Lampiran 1

a. Komposisi dan pembuatan media

Komposisi cat Gram :

Cat Gram A :

Kristal violet	2 gram
Alkohol 96%	20 cc
Amonium oksalat 1 % dalam aquades	80 cc

Cat Gram B :

Iodium	1 gram
Kalium iodida	2 gram
Aquades	300 cc

Cat Gram C :

Aceton	30 cc
Alkohol	70 cc

Cat Gram D :

Safranin	1 gram
Alkohol 96%	10 cc
Aquades	90 cc

Nurien cair (PH :7,4)

Formula :

Lab lemco	1 gram
Yeast extract	2 gram
Pepton	5 gram
NaCl	5 gram
Aquades	1000 ml

Cara membuat :

Larutan 13 gram serbuk nurien cair dalam satu liter aquades campur baik-baik dan aturlah pH \pm 7 dengan menambahkan HCl atau H₂SO₄, kemudian distribusikan dalam

tabung percobaan yang diperlukan. Sterilisasi dengan otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Nutrien agar miring (PH :7,4)

Formula :

Lab lemco	1 gram
Yeast extract	2 gram
Pepton	5 gram
NaCl	5 gram
Agar	15 gram

Cara membuat :

Timbang nutrien cair 13 gram larutkan dalam 1 liter aquades, dan aturlah pH \pm 7 dengan menambahkan HCl atau H₂SO₄, kemudian tambahkan agar sebanyak 1,5%. Distribusikan dalam tabung-tabung percobaan yang diperlukan. Sterilisasi dengan otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian dinginkan dengan cara dimiringkan.

Agar darah

Formula :

Media agar	4%
Darah kambing bebas fibrin	

Cara membuat :

200 cc filtrat agar 4 % masukkan dalam erlenmeyer steril volume 300-400 cc. Sterilkan dengan otoklaf 121°C selama 15 menit atau dengan sterilisasi bertingkat. Setelah steril botol diangkat dan didinginkan sampai 56°C, tambahkan darah kambing bebas fibrin dan campurlah dengan baik (jumlah darah yang dimasukkan 5-10%, kocok pelan-pelan agar campuran tersebut homogen).

Manitol cair (PH : 7,4 \pm 0,1)

Formula (gram perliter) :

D (-) Manitol	10
Lab lemco	1 gram
Yeast extract	2 gram
Pepton	5 gram
NaCl	5 gram

Indikator merah fenol	0,025
Aquades	1000 ml

Cara pembuatan :

Timbang nutrien cair 13 gram dan campurkan dengan D (-) Manitol dalam 1 liter aquades dan Panaskan sampai semua terlarut dengan pengadukan yang teratur kemudian aturlah pH > 7 dengan menambahkan HCl atau H₂SO₄, Kemudian tambahkan indikator merah fenol, Distribusikan dalam tabung-tabung percobaan yang dilengkapi dengan tabung durham, Sterilisasi dalam otoklaf (15 menit pada 121 °C).

Glukosa cair (PH >7)

Formula :

Glukosa	10 gram
Lab lemco	1 gram
Yeast extract	2 gram
Pepton	5 gram
NaCl	5 gram
Indikator merah fenol	0,025
Aquades	1000 ml

Cara membuat :

Timbang nutrien cair 13 gram dan campurkan dengan glukosa dalam 1 liter aquades dan panaskan sampai semua terlarut dengan pengadukan yang teratur kemudian aturlah pH > 7 dengan menambahkan HCl atau H₂SO₄, kemudian tambahkan indikator merah fenol, Distribusikan dalam tabung-tabung percobaan yang dilengkapi dengan tabung durham, Sterilisasi dalam otoklaf (15 menit pada 121 °C).

Fruktosa cair (PH >7)

Formula :

Fruktosa	10 gram
Lab lemco	1 gram
Yeast extract	2 gram
Pepton	5 gram
NaCl	5 gram
Indikator merah fenol	0,025

Aquades 1000 ml

Cara membuat :

Timbang nutrien cair 13 gram dan campurkan dengan fruktosa dalam 1 liter aquades dan Panaskan sampai semua terlarut dengan pengadukan yang teratur kemudian aturlah pH > 7 dengan menambahkan HCl atau H₂SO₄, kemudian tambahkan indikator merah fenol, Distribusikan dalam tabung-tabung percobaan yang dilengkapi dengan tabung durham, Sterilisasi dalam otoklaf (15 menit pada 121 °C).



Lampiran 2

a. Sterilisasi alat :

Alat-alat gelas yang digunakan semuanya disterilisasi dengan menggunakan otoklaf pada suhu 121°C selama 15-20 menit, Ose disteriliasi dengan dibakar diatas nyala api hingga membara, Laminar Air Flow disterilkan dengan cara disinari UV selama 20 menit dan disemprot dengan alkohol.

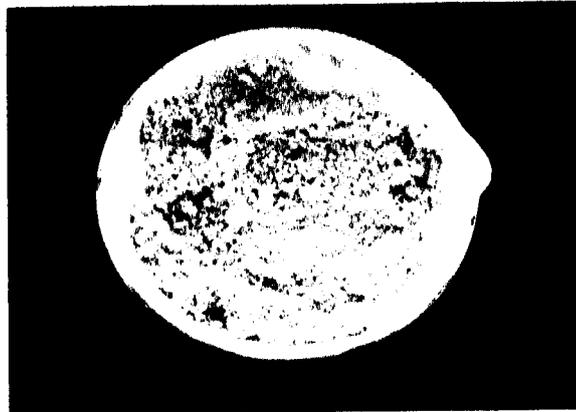
b. Pembuatan stok bakteri *Staphylococcus epidermidis*

Bakteri diambil dari biakan murni sebanyak satu mata ose kemudian digoreskan pada media agar miring dalam tabung reaksi. Tabung kemudian diinkubasi selama 24 jam pada temperatur 37°C. Setelah terlihat pertumbuhan bakteri, tabung disimpan dalam lemari pendingin sebagai stok bakteri.

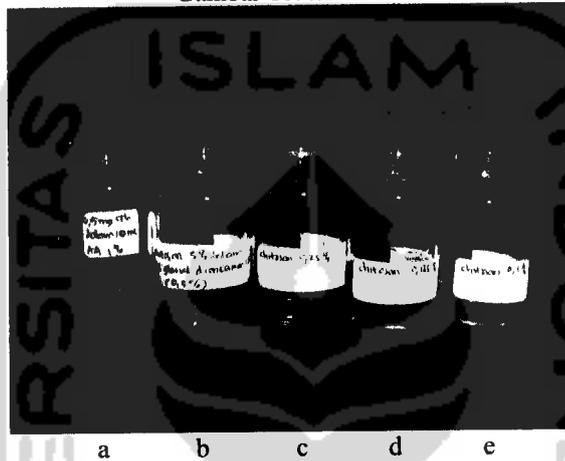
c. Pembuatan suspensi bakteri

Bakteri diambil dari stok bakteri sebanyak satu mata ose, kemudian disuspensikan kedalam 1 ml nutrien cair dan diinkubasikan pada temperatur 37°C selama 24 jam. Bakteri yang telah disuspensikan kedalam nutrien cair disesuaikan kadarnya dengan standar Brown dengan menambahkan aquades steril atau larutan fisiologis. Cara menyamakan kekeruhan adalah sebagai berikut :

- Untuk bakteri yang homogen maka dibuat konsentrasi sama dengan standar Brown dengan menggunakan spektrofotometer UV/Vis, kemudian dibuat pengenceran dengan konsentrasi 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} untuk membuat persamaan kurva baku.
- Untuk bakteri yang tidak homogen maka dicari bakteri lain yang homogen (sebagai standar) kemudian dibuat konsentrasi sama dengan standar Brown dengan menggunakan spektrofotometer UV/Vis lalu ditanam kedalam nutrien agar dengan cara taburan, kemudian dihitung jumlah bakterinya. Untuk membandingkan dengan *Staphylococcus epidermidis* maka dibuat pengenceran *Staphylococcus epidermidis* beberapa kali kemudian ditanam kedalam nutrien agar dengan cara taburan, kemudian dihitung jumlah bakterinya dan dipakai yang jumlahnya mendekati standar.



Gambar 10. khitosan.



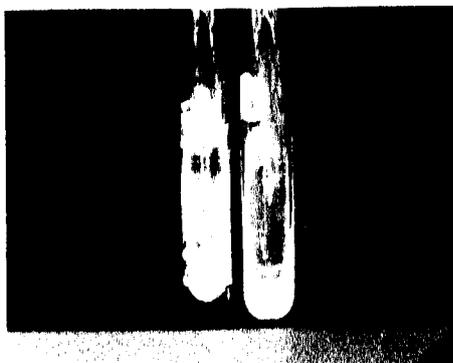
Gambar 11. khitosan yang dilarutkan dalam asam asetat glasial 0,1%.

Ket :

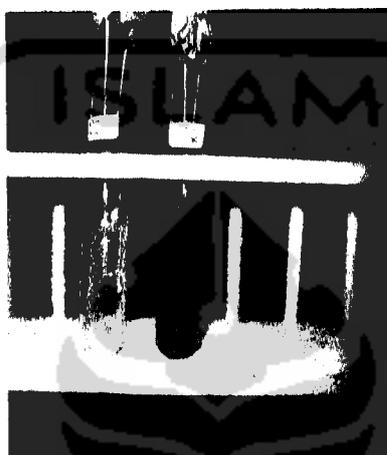
- a : khitosan kadar 5%
- b : khitosan kadar 0,5%
- c : khitosan kadar 0,25%
- d : khitosan kadar 0,125%
- e : khitosan kadar 0,15%



Gambar 12. Pertumbuhan *Staphylococcus epidermidis* dalam agar darah.



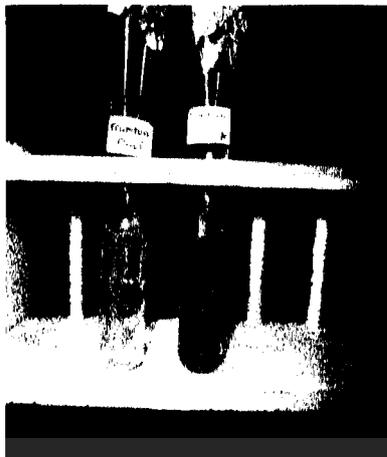
Gambar 13. Hasil Uji Katalase.



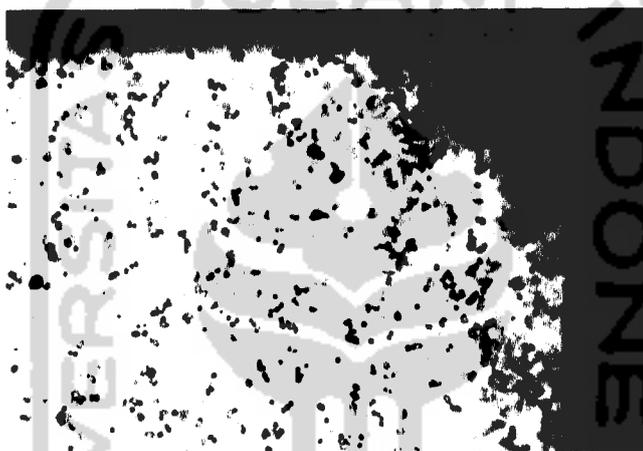
Gambar 14. Hasil fermentasi Glukosa.



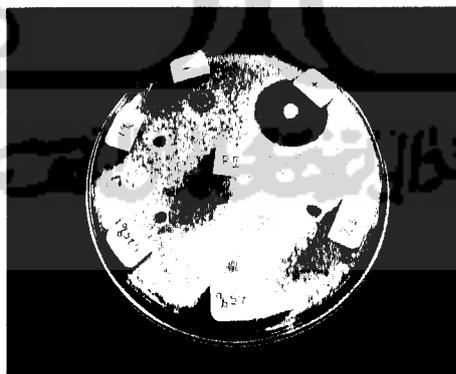
Gambar 15. Hasil fermentasi Manitol.



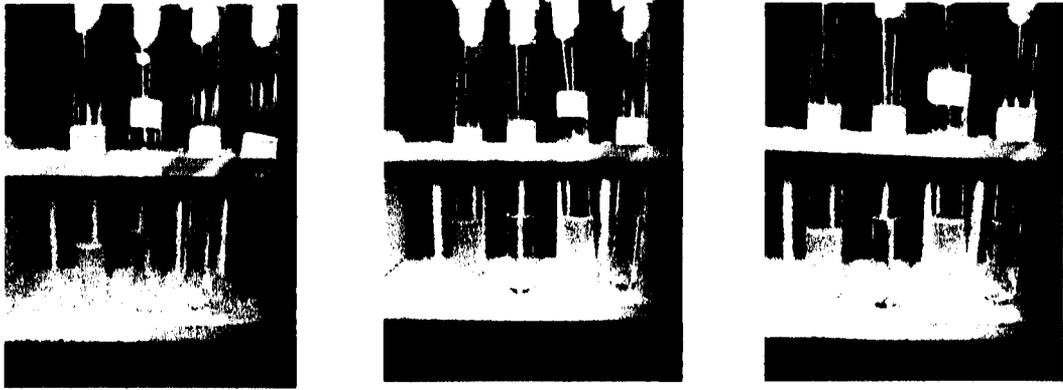
Gambar 16. Hasil fermentasi Fruktosa.



Gambar 17. *Staphylococcus epidermidis* hasil identifikasi.



Gambar 18. Hasil uji aktivitas khitosan terhadap *Staphylococcus epidermidis* dengan metode difusi padat cara sumuran dalam media nutrien agar.



Gambar 19. Hasil uji Penghambatan *Staphylococcus epidermidis* oleh khitosan dalam media nutrien cair.



Dari berbagai pengenceran diatas, dipilih jumlah bakteri yang digunakan dalam perhitungan yang memenuhi syarat sebagai berikut (Jutono dkk., 1973) :

1. Jumlah koloni tiap petridish antara 30-300 koloni, jika memang tidak ada yang memenuhi syarat dipilih yang jumlahnya mendekati 300.
2. Tidak ada koloni yang menutup lebih besar dari setengah luas petridish.
3. Perbandingan jumlah bakteri dari hasil pengenceran yang berturut-turut antara pengenceran yang lebih besar dengan pengenceran sebelumnya, jika sama atau lebih kecil dari 2 hasilnya dirata-rata, tetapi jika lebih besar dari 2 yang dipakai jumlah bakteri hasil pengenceran sebelumnya.

Jumlah bakteri yang dipakai dalam perhitungan :

BAKTERI + KHITOSAN

Waktu (jam)	Jumlah bakteri	
	Replikasi 1	Replikasi 2
0	695	395
1	750	810
2	12000	15050
3	15050	16400
6	18050	1000
24	2160000	14550
27	3000000	1550000
30	3100000	1050000
72	3500000	1605000
75	2700000	2132500

BAKTERI SAJA

Waktu (jam)	Jumlah bakteri	
	Replikasi 1	Replikasi 2
0	750	710
1	1300	1500
2	15300	15000
3	127500	15250
6	18500	10050
24	1850000	1605000
27	2200000	2100000
30	2700000	1315000
72	3000000	1560000
75	2600000	1475000

Jumlah bakteri yang dipakai dalam perhitungan (log) :

BAKTERI + KHITOSAN

Waktu (jam)	Jumlah bakteri (log)	
	Replikasi 1	Replikasi 2
0	2,84	2,60
1	2,87	2,91
2	4,08	4,18
3	4,18	4,21
6	4,26	3,00
24	6,33	4,16
27	6,48	6,19
30	6,49	6,02
72	6,54	6,20
75	6,43	6,31

BAKTERI SAJA

Waktu (jam)	Jumlah bakteri (log)	
	Replikasi 1	Replikasi 2
0	2,87	2,85
1	3,11	3,18
2	4,18	4,18
3	5,10	4,18
6	4,27	4,00
24	6,27	6,20
27	6,34	6,32
30	6,43	6,01
72	6,48	6,19
75	6,41	6,17

Jumlah generasi (n):

$$n = \frac{\log N - \log N_0}{0,301}$$

Konstanta kecepatan pertumbuhan (k):

$$k = n/t = k = \frac{\log N - \log N_0}{0,301t}$$

Waktu generasi (g):

$$g = 1/k$$

Kecepatan pertumbuhan secara praktis (μ):

$$\mu = 0,693k$$

keterangan:

- t = waktu pertumbuhan
 N = populasi bakteri akhir
 No = populasi bakteri mula-mula

Isolat	Media ditambah	n		k		μ (jam ⁻¹)		g (jam)	
		R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
<i>S. epidermidis</i>	khitosan	12,29	12,325	0,17	0,164	0,12	0,113	5,88	6,097
<i>S. epidermidis</i>	-	11,99	11,528	0,17	0,426	0,12	0,295	5,88	2,347