

## Nanokitosan Efektif Menekan Jumlah Bakteri Gram Negatif dan Gram Positif Penyebab Endometritis pada Sapi Friesian Holstein secara *In Vitro*

(*NANOCITOSAN EFFECTIVELY SUPPRESSES BACTERIA GRAM NEGATIVE AND GRAM POSITIVE CAUSES OF ENDOMETRITIS IN FRIESIAN HOLSTEIN COW IN VITRO*)

Edelina Sinaga<sup>1</sup>, Ni Wayan Kurniani Karja<sup>1,2</sup>, Andriani<sup>3</sup>, Amrozi<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Biologi Reproduksi, Sekolah Pascasarjana;

<sup>2</sup>Divisi Reproduksi dan Kebidanan,

Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi

Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

Jl. Agathis Kampus IPB Dramaga, Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16680

<sup>3</sup>Balai Besar Penelitian Veteriner,

Jl RE Martadinata No 30 Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16114

Email: amrozi217@gmail.com

### ABSTRACT

This study was conducted to isolate and identify the caused bacteria of endometritis in *Friesian Holstein* (FH) and assessed the effectiveness of nanochitosan against bacterial endometritis *in vitro*. Sample was collected from six FH cows with subclinical endometritis was examined by ultrasonography, then was calculated the number of colonies, isolation and identification of bacteria. Nanochitosan was calculated the protein content and made into neutral pH with concentrations of 0,5%, 1% and 2%. The results showed that the highest total plate count in the endometrial fluid was founded at number 626 with  $4,7 \pm 0,6$  Log cells/mL and the lowest was found at number 532 with  $3,3 \pm 0,8$  Log cells/mL. Bacteria in the Endometritis fluid was founded Gram-negative bacteria were *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella* sp. Furthermore, Gram-positive bacteria were founded *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp. and *S. pyogenes*. The challenge test of nanochitosan 1% and 2% with *E. coli* showed insignificant results when compared with positive controls ( $P > 0,05$ ). Nanochitosan with all concentrations can reduced number colonies of *P. aeruginosa* and *Bacillus* sp. significantly compared with negative controls ( $P < 0,05$ ). The challenge test of nano chitosan 0,5% and 2% were able to reduced the number of *S. aureus* and *Klebsiella* sp. colonies but could not reduce of *S. pyogenes*. These findings showed treatment of nanochitosan as an antibacterial is able to reduce the number of *E. coli*, *Klebsiella* sp. and *P. aeruginosa* and *Bacillus* sp. and *S. aureus*

Keywords: bacteria; endometritis; FH cows; *in vitro*; nanochitosan

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri penyebab endometritis pada sapi *Friesian Holstein* (FH) serta menganalisis efektivitas nanokitosan secara *in vitro* terhadap bakteri penyebab endometritis. Sampel dikoleksi dari enam ekor sapi FH yang mengalami endometritis subklinis setelah dilakukan pemeriksaan dengan ultrasonografi/USG, kemudian dilakukan perhitungan jumlah koloni, isolasi dan identifikasi bakteri. Nanokitosan diukur kadar proteinnya dan dibuat menjadi pH netral dengan konsentrasi 0,5%, 1% dan 2% untuk digunakan pada tahap ujiantang dengan bakteri endometritis yang ditemukan. Hasil penelitian menunjukkan *total plate count* (TPC) pada cairan endometrium sapi FH paling tinggi terdapat pada sapi perah FH nomor 626 sebanyak  $4,7 \pm 0,6$  Log sel/mL dan terendah terdapat pada nomor 532 sebanyak  $3,3 \pm 0,8$  Log sel/mL. Beberapa bakteri Gram negatif yang ditemukan pada penelitian ini yaitu *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Klebsiella* sp. Bakteri Gram positif yang ditemukan adalah *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp. dan *S. pyogenes*. Uji

tantang nanokitosan pada bakteri *E. coli* dengan konsentrasi 1% dan 2% menunjukkan hasil yang tidak signifikan jika dibandingkan dengan kontrol positif ( $P>0,05$ ). Nanokitosan dengan semua konsentrasi mampu menurunkan jumlah bakteri *Klebsiella* sp. dan *P. aeruginosa* serta pada bakteri *Bacillus* sp. secara signifikan jika dibandingkan dengan kontrol negatif ( $P<0,05$ ). Uji tantang nanokitosan 0,5% dan 2% mampu menurunkan jumlah koloni *S. aureus* tetapi tidak dapat menurunkan jumlah koloni *S. pyogenes*. Dapat disimpulkan bahwa pemberian nanokitosan sebagai antibakteri mampu menurunkan jumlah koloni bakteri Gram negatif (*E. coli*, *Klebsiella* sp. dan *P. aeruginosa*) dan Gram positif (*Bacillus* sp dan *S. aureus*).

Kata-kata kunci: bakteri; endometritis; *in vitro*; nanokitosan; sapi FH

## PENDAHULUAN

Peradangan uterus (endometritis) dapat disebabkan oleh berbagai mikroorganisme (LeBlanc *et al.*, 2002). Endometritis diklasifikasikan menjadi dua kategori yaitu endometritis klinis (EK) dan endometritis subklinis (ES) (Kasimanickam *et al.*, 2004). Endometritis klinis ditandai dengan adanya leleran/*discharge* uterus purulen atau mukopurulen yang dapat dideteksi secara eksternal di vagina anterior (LeBlanc *et al.*, 2002; Kasimanickam *et al.*, 2004). Endometritis subklinis sementara itu tidak memperlihatkan adanya tanda-tanda tersebut (Kasimanickam *et al.*, 2004). Endometritis memiliki dampak kerugian ekonomi yang besar bagi peternak, hal tersebut disebabkan karena adanya penurunan keberhasilan reproduksi. Beberapa hal dapat meningkatkan risiko terjadinya endometritis di antaranya adalah kejadian aborsi, kelahiran pada kebuntingan kembar, kerusakan kanal/jalan kelahiran, kelanjutan kasus distokia atau retensi plasenta, dan kegiatan inseminasi buatan yang tidak *lege artis* (Ball dan Peters, 2004). Banyak mikroorganisme yang dapat menyebabkan endometritis pada sapi, di antaranya *Arcanobacterium pyogenes*, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium necrophorum*, *Escherichia coli*, *Streptococcus* sp., *Clostridia* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Staphylococcus* sp. (Seals *et al.*, 2002; Azawi 2008).

Kejadian endometritis dapat didiagnosis melalui palpasi rektal, isolasi dan identifikasi koloni bakteri, biopsi endometrium, pemeriksaan sitologi dan ultrasonografi. Identifikasi dan perhitungan jumlah bakteri menjadi salah satu alternatif alat diagnosis yang dapat dilakukan, sehingga pengobatan endometritis dapat optimal (DPKH Lampung, 2012). Pengobatan endometritis selama ini dilakukan dengan pemberian antibiotik, namun menurut Murdati (1997) antibiotik diketahui

sering berdampak negatif dan menjadi residu yang ditemukan pada susu. Kehadiran residu antibiotik pada susu dapat menyebabkan reaksi alergi, keracunan, dan resistansi antibiotik. Sehingga perlu dilakukan analisis terhadap terapi endometritis menggunakan bahan selain antibiotik, salah satunya adalah menggunakan kitosan.

Kitosan merupakan salah satu jenis polimer alami yang dihasilkan dari proses *deasetilasi* kitin (Goy *et al.*, 2009). Kitin diproduksi dari limbah hewan bercangkang seperti: udang dan rajungan (pada bagian kulit kepala, kaki dan ekor) serta cangkang kerang (Shahidi dan Abuzaytoun, 2005). Karakteristik kitosan dapat dipengaruhi oleh aktivitas biologisnya, termasuk berat molekul, derajat *deasetilasi*, bentuk garam (-ve ion), dan bentuk struktural (á, â, ã) (Kean dan Thanou, 2010). Berat molekul dan derajat *deasetilasi* merupakan faktor utama yang memengaruhi ukuran partikel (Singh *et al.*, 2015). Kitosan mempunyai derajat *deasetilasi* berkisar antara 70-95% dan berat molekul yang bervariasi mulai dari 10-1000 kDa (Esmaeili *et al.*, 2010). Semakin kecil ukuran partikel, maka luas permukaan partikel akan semakin besar sehingga meningkatkan kemampuan kitosan sebagai absorben, antijamur, antibakteri (Luis *et al.*, 2011), dan antiparasit (El-Sharif dan Hussain, 2011).

Dua mekanisme utama kitosan dalam menghambat sel mikrob, yaitu melalui sifat polikationiknya (Chung *et al.*, 2004; Je dan Kim, 2006) dan sifat kitosan yang dapat memblokir transkripsi DNA bakteri (Liu *et al.*, 2001; Raafat dan Sahl, 2009). Sifat polikationik kitosan mampu mengganggu metabolisme bakteri melalui interaksi elektrostatis di permukaan sel bakteri (Chung *et al.*, 2004; Je dan Kim, 2006). Kitosan lebih lanjut mampu menembus sel dan memblokir transkripsi DNA sehingga tidak terjadi sintesis RNA dan protein (Liu *et al.*, 2001; Raafat dan Sahl, 2009). Penelitian Jeon *et al.* (2014) menunjukkan bahwa mikropartikel

kitosan dengan konsentrasi 0,2% yang diuji secara *in vitro* maupun *in vivo* mampu menurunkan jumlah bakteri *E. coli* pada sapi yang mengalami metritis (Jeon *et al.*, 2014). Menurut Xing *et al.* (2009) nanokitosan sebagai antibakteri mampu menghambat *E. coli* dan *S. aureus*. Oleh karena itu, perlu dilakukan pengujian efektivitas nanokitosan untuk terapi endometritis pada sapi di Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri penyebab endometritis pada sapi *Frisian Holstein* (FH) serta efektivitas nanokitosan terhadap bakteri endometritis secara *in vitro*.

## METODE PENELITIAN

### Waktu dan Lokasi Penelitian

Sampel cairan endometrium dikoleksi dari sapi *Frisian Holstein* di Peternakan Rakyat, Kawasan Usaha Peternakan (Kunak) Cibungbulang, Kabupaten Bogor. Analisis sampel dilakukan di Laboratorium Bakteriologi, Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor (BB Litvet).

### Tahap I. Preparasi Nanokitosan.

Sebanyak 20 g nanokitosan (PT. Nanotech Herbal, Serpong, Indonesia) dimasukkan ke dalam *centrifuge tube* steril dan dilakukan uji kadar protein di Balai Besar Pascapanen, Bogor. Nanokitosan yang digunakan untuk pengujian antibakteri dilakukan netralisasi terlebih dahulu pada pH 7.

Konsentrasi nanokitosan yang digunakan untuk uji antibakteri pada penelitian ini adalah 0,5, 1, dan 2%. Penyiapan nanokitosan dilakukan dengan melarutkan 1 g nanokitosan dalam 1 mL HCl 10% (konsentrasi nanokitosan adalah 100 % dalam HCl 10%), kemudian dari sampel nanokitosan tersebut dibuat larutan nanokitosan 10% dengan menambahkan *mili Q water* steril. Larutan nanokitosan 0,5, 1, dan 2 % disiapkan dari larutan kitosan 10% dengan menambahkan media *broth* (media *Brain Heart Infusion* untuk uji bakteri Gram positif dan media *Nutrient Broth* untuk uji bakteri Gram negatif. pH dari semua larutan yang digunakan untuk uji kemudian dibuat menjadi pH 7 dengan menambahkan NaOH 2N.

*Gentamisin inject* diambil 1 mL dimasukkan ke dalam 19 mL media *broth* sebagai kontrol positif. *Penisilin-streptomisin inject* diambil 1 mL dimasukkan ke dalam 19 mL media *broth* sebagai kontrol positif.

Penisilin-G (MEIJI, Pasuruan, Indonesia) ditimbang sebanyak 0,002 g dan streptomisin sulfat (MEIJI, Pasuruan, Indonesia) sebanyak 0,02 g kemudian dicampurkan dan dimasukkan ke dalam media *broth* sebagai kontrol positif, lalu disterilkan selama 15 menit pada suhu 121 °C. Nanokitosan 2%, 1%, 0,5%, gentamisin inject, Penstrep inject, penstrep meiji dimasukkan ke dalam penangas air/*waterbath shaker* dengan 140 rpm dan 37 °C selama 24 jam.

### Tahap II. Koleksi Sampel

#### Koleksi Sampel Cairan Uterus.

Sebanyak 10 ekor sapi perah FH diperiksa berdasarkan anamnesis yang diperoleh dokter hewan di Kunak. Sapi tersebut kemudian diperiksa keadaan uterus dengan palpasi per rektal dan dikonfirmasi menggunakan USG untuk peneguhan diagnosis endometritis. Sebanyak enam ekor sapi yang positif endometritis kemudian dikoleksi cairan uterusnya sebagai sampel. Koleksi cairan uterus diawali dengan pencucian bagian perineum sapi, dikeringkan dengan *tissue* bersih, dan dibilas dengan alkohol. Terhadap sapi tersebut selanjutnya dilakukan *flushing* menggunakan ± 50 mL larutan NaCl steril, diirigasi ke dalam lumen uterus, kemudian dilakukan koleksi sampel cairan uterus secara aspirasi menggunakan *gun* Inseminasi Buatan yang steril. Sampel cairan uterus dikoleksi dengan cara dimasukkan ke dalam *centrifuge tube* steril dibawa ke Laboratorium Bakteriologi BB Litvet menggunakan *cool box* suhu ± 4 °C selama enam jam dan disiapkan untuk pengujian selanjutnya isolasi dan identifikasi bakteri.

### Tahap III. Uji Mikrobiologi

#### Penghitungan Jumlah Koloni Bakteri Sebelum Identifikasi.

Cairan uterus yang didapatkan kemudian dicampurkan dengan *buffer saline* (1:9, v/v). Campuran tersebut diencerkan sebanyak enam kali pengenceran. Masing-masing pengenceran diambil 100 µL campuran dan dimasukkan ke dalam cawan petri steril. Sebanyak 15 mL *plate count agar* (PCA) hangat (44-46 °C) selanjutnya dituangkan ke dalam cawan petri berisi suspensi bakteri yang telah diencerkan sebelumnya. Campuran tersebut kemudian dihomogenkan secara perlahan dan dibiarkan memadat. Cawan petri setelah itu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Bakteri yang tumbuh setelah inkubasi

dihitung jumlah total koloni bakteri dengan tujuan untuk mengetahui keberadaan bakteri dalam sampel yang dikoleksi.

**Isolasi dan Identifikasi Bakteri.** Isolasi bakteri dilakukan dengan cara memasukkan 200  $\mu$ L cairan uterus di atas permukaan berbagai media kemudian diratakan ke seluruh permukaan menggunakan ose. Adapun media agar yang digunakan adalah *Mac Conkey Agar* (MCA) untuk menumbuhkan bakteri Gram negatif, media *Blood Agar* (BA) untuk menumbuhkan bakteri Gram positif dan negatif, dan media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) untuk menumbuhkan bakteri *E. coli*. Cawan petri yang sudah ditanam bakteri kemudian diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37 °C dengan posisi cawan petri terbalik (untuk mencegah koloni menyebar). Setelah inkubasi, isolat bakteri diamati secara morfologi kemudian koloni yang berbeda dimurnikan dengan *Nutrien Agar* (NA). Isolat bakteri yang sudah murni kemudian diidentifikasi jenis bakterinya. Identifikasi bakteri dilakukan dengan pengujian motilitas, pewarnaan Gram, uji *katalase* dan oksidase, dan pengujian terhadap 12 jenis gula-gula. Bakteri spesifik yang didapatkan kemudian ditantang dengan nanokitosan.

#### Tahap IV. Pengujian Efektivitas Nanokitosan sebagai Antibakteri

**Preparasi Suspensi Bakteri dan Pra-perlakuan Efektivitas Nanokitosan.** Isolat bakteri yang didapatkan pada tahap sebelumnya selanjutnya diremajakan terlebih dahulu selama 24 jam. Isolat bakteri *E. coli*, *Klebsiella* sp., dan *P. aeruginosa* diencerkan bertingkat dari  $10^{-1}$  hingga  $10^{-5}$  dengan larutan fisiologis steril. Isolat bakteri *Bacillus* sp., *Streptococcus* sp., *S. aureus* diencerkan bertingkat dari  $10^{-1}$  hingga  $10^{-7}$  dengan larutan fisiologis steril. Isolat bakteri tersebut kemudian diuji dengan nanokitosan konsentrasi 0,5%, 1%, dan 2%, sebagai kontrol positif digunakan Penilisin-G (Meiji, Pasuruan, Indonesia)-streptomisin sulfat (Meiji, Pasuruan, Indonesia), Genta-100 (TMC, Bandung, Indonesia), dan Pen & Strep (Norbrook Laboratories Ltd., Newry, Inggris). Sebanyak 1 mL gentamisin inject dan penstrep inject dimasukkan ke dalam 19 mL media *broth*, masing-masing. Sebanyak 2 mg penisilin dan 0,02 g streptomisin dicampurkan ke dalam 80 mL media *broth* dan disterilkan selama 15 menit 121 °C. Semua sampel perlakuan nanokitosan 0,5%, 1%, 2%, gentamisin *inject*, penstrep *inject*, penstrep meiji dimasukkan ke dalam penangas

air/*waterbath shaker* dengan kecepatan 140 rpm dan suhu 37 °C selama 24 jam. Kontrol negatif hanya menggunakan media *broth* yang dicampur dengan bakteri.

**Efektivitas Nanokitosan.** Sebanyak 1 mL *E. coli*, *Klebsiella* sp. dan *P. aeruginosa* pengenceran  $10^{-5}$  dan  $10^{-7}$  untuk *Bacillus* sp., *Streptococcus pyogenes* dan *S. aureus*) masing-masing dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer ke-1 (media *broth* sebagai kontrol negatif), labu erlenmeyer ke-2 (gentamisin *inject*), labu erlenmeyer ke-3 (penisilin-streptomisin Meiji), labu erlenmeyer ke-4 (penisilin-streptomisin *inject*), labu erlenmeyer ke-5 (nanokitosan 0,5%), labu erlenmeyer ke-6 (nanokitosan 1%), labu erlenmeyer ke-7 (nanokitosan 2%) dan diinkubasi selama satu jam di suhu ruang. Setelah satu jam, sebanyak 1 mL suspensi (*E. coli* dan *Klebsiella* sp., *P. aeruginosa* dan *Bacillus* sp.) ketujuh perlakuan, masing-masing dimasukkan ke dalam cawan petri dan ditambahkan media PCA dengan menggunakan teknik *pour plate* serta (*S. pyogenes* dan *S. aureus*) dengan menggunakan teknik *spread plate*. Campuran tersebut dibiarkan hingga memadat dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C untuk bakteri *E. coli*, *Klebsiella* sp., *S. aureus*, dan *S. pyogenes*, pada 40 °C untuk *Bacillus* sp., serta suhu 42 °C untuk bakteri *P. aeruginosa* dengan posisi cawan petri terbalik. Semua perlakuan setelah inkubasi dilakukan penghitungan terhadap jumlah total koloni bakteri.

#### Analisis Data

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan masing-masing perlakuan terdiri atas empat kali ulangan. Data *total plate count* efektivitas kitosan terhadap bakteri endometritis dianalisis secara statistika menggunakan sidik ragam/*Analysis of Variance* pada taraf nyata 95%. Perbedaan yang nyata antar perlakuan, diuji lanjut dengan uji jarak berganda Duncan. Data diolah menggunakan program SPSS versi 24.0.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Karakteristik Nanokitosan

Aktivitas antimikrob nanokitosan secara *in vitro* dipengaruhi oleh faktor intrinsik dan ekstrinsik. Faktor intrinsik di antaranya jenis, berat molekul, derajat *deasetilasi*, viskositas, ukuran partikel, pelarut dan konsentrasi.

Adapun faktor ekstrinsik di antaranya yaitu *strain* uji, keadaan fisiologis, media kultur bakteri dan pH (Rafaat dan Sahl, 2008). Karakteristik nanokitosan yang digunakan dalam penelitian ini disajikan pada Tabel 1. Tabel 1 menunjukkan bahwa kitosan yang digunakan merupakan kitosan dengan ukuran 395,3 nm. Menurut Tiyaboonchai (2003), ukuran nanokitosan berkisar antara 1-1000 nm. Menurut Aloys *et al.* (2016) partikel nanokitosan dengan ukuran antara 100-600 nm telah dibuat dengan berbagai metode, seperti gelasi ionik (Calvo *et al.*, 1997), emulsi *cross-linking* (Rieggera *et al.*, 2018), koalesensi tetesan emulsi (Balcerzak *et al.*, 2013), proses *reverse micellar* (Zhao 2011), dan pengayakan (Agnihotri 2004). Penggunaan nanokitosan diharapkan agar partikel tersebut mampu masuk ke dalam sel dan mendapatkan hasil terapi yang maksimal. Menurut Luis *et al.* (2011), semakin kecil ukuran partikel kitosan maka luas permukaan partikel semakin besar sehingga meningkatkan kemampuan kitosan sebagai absorben, antijamur, antibakteri. El-Sharif dan Hussain (2011) menambahkan bahwa kitosan dengan ukuran yang kecil mampu berperan sebagai antiparasit. Kadar protein dari nanokitosan

sebanyak 1,1% diukur dengan tujuan untuk menghindari reaksi alergi. Menurut standar mutu kitosan (Protan Laboratorium Inc), kadar protein yang menyebabkan alergi yaitu yang di atas 5%. Kitosan dari udang mengandung protein tropomiosin dan protein tersebut biasanya menyebabkan reaksi alergi (Liu *et al.*, 2010). Derajat keasaman (pH) nanokitosan yang didapatkan adalah 4, namun untuk menghindari hasil bias terhadap antibakteri karena sifat asam dari kitosan maka nanokitosan tersebut dinetralkan derajat keasamannya.

**Isolasi dan Identifikasi Bakteri dari Cairan Endometrium**

Jumlah koloni dan jenis bakteri yang dapat diisolasi dan diidentifikasi dari cairan endometrium sapi yang mengalami endometritis subklinis disajikan pada Tabel 2. Jumlah koloni bakteri atau *total plate count* (TPC) pada keenam sampel cairan endometrium sapi FH paling tinggi terdapat pada sapi nomor 626 yaitu sebanyak 4,7 ± 0,6 Log sel/mL dan jumlah koloni bakteri terendah terdapat pada sapi nomor 532 yaitu 3,3 ± 0,8 Log sel/mL. Beberapa bakteri Gram negatif, ditemukan pada penelitian ini yaitu *E. coli*, *P. aeruginosa*, dan *Klebsiella* sp. Lebih lanjut, bakteri Gram positif yang ditemukan pada penelitian ini adalah *S. aureus*, *Bacillus* sp. dan *S. pyogenes*. Bakteri yang sering ditemukan pada keenam sampel cairan uterus endometritis yaitu *Bacillus* sp., *P. aeruginosa*, *Klebsiella* sp. (Seals *et al.*, 2002; Moges *et al.*, 2013; Wagener *et al.*, 2015). Penelitian Liu *et al.* (2013) melaporkan bahwa *Staphylococci* merupakan kelompok bakteri patogen dominan (21,8%) penyebab endometritis klinis utama yang dapat dideteksi pada sapi

Tabel 1. Karakteristik nanokitosan yang digunakan dalam penelitian

Parameter	Nanokitosan
Ukuran Partikel	395,3 nm
Kadar Protein	1,1 %
pH awal nanokitosan	4
pH akhir nanokitosan	7

Tabel 2. *Total plate count* (TPC) dan jenis bakteri dari cairan endometrium sapi yang mengalami endometritis subklinis

No Sampel Sapi	<i>Total Plate Count</i> (Log sel/mL) ± SEM	Bakteri					
		<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Bacillus</i> sp.	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. aureus</i>
206	4,2 ± 0,8	-	t	t	t	t	-
312	4,2 ± 0,7	t	t	t	t	-	t
532	3,3 ± 0,8	t	t	t	t	-	t
626	4,7 ± 0,6	t	t	t	t	t	-
820	3,4 ± 1,0	t	t	t	t	t	-
861	4,5 ± 0,6	-	-	t	t	-	-

Keterangan: t: Ada; -: Tidak ada; SEM: *Standard error of measurement*

perah. Williams *et al.* (2007) lebih lanjut menemukan bahwa *S. aureus* merupakan penyebab utama endometritis klinis pada sapi perah.

### Pengujian Efektivitas Nanokitosan sebagai Antibakteri

Pengujian efektivitas kitosan terhadap bakteri Gram negatif dan positif disajikan pada Tabel 3. Pemberian nanokitosan dengan konsentrasi 1% dan 2% mampu menurunkan jumlah bakteri *E. coli* secara signifikan jika dibandingkan dengan kontrol negatif ( $P < 0,05$ ). Nanokitosan pada konsentrasi 2% menunjukkan efektivitas yang sama dengan kontrol positif (gentamisin, penstrep powder, dan penstrep inject) ( $P > 0,05$ ). Ujiantang nanokitosan pada konsentrasi 0,5% dan 2% mampu menurunkan jumlah bakteri *Klebsiella* sp. sebesar 0,1 Log sel/mL, *P. aeruginosa* dan *Bacillus* sp. secara signifikan jika dibandingkan dengan kontrol negatif ( $P < 0,05$ ). Ujiantang nanokitosan 0,5% dan 2% mampu menurunkan jumlah koloni *S. aureus* tetapi tidak mampu menurunkan jumlah koloni *S. pyogenes*.

Pemberian nanokitosan secara *in vitro* berdasarkan data tersebut menunjukkan bahwa mampu menurunkan jumlah koloni bakteri Gram negatif. Pemberian kitosan terhadap bakteri Gram negatif berfungsi sebagai agen antibakteri secara pasif yaitu dengan mengurangi protein pada permukaan dinding sel yang berfungsi untuk merusak *adhesi* bakteri (Francolini *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015). Hal tersebut menunjukkan bahwa kitosan tidak

dapat membunuh bakteri tetapi menghambat bakteri. Proses menghambat bakteri dapat diwujudkan dengan tolakan hidrofilik/hidrofobik, dan tolakan elektrostatis (Matica *et al.*, 2017). Penelitian Park *et al.* (2004) dan Du *et al.* (2009) melaporkan bahwa bakteri Gram negatif lebih rentan terhadap kitosan. Chung *et al.* (2004) juga mengemukakan bahwa hidrofilitas bakteri Gram negatif lebih tinggi daripada bakteri Gram positif sehingga sensitif terhadap kitosan. Nanokitosan dengan konsentrasi 2% mampu secara efektif membunuh bakteri *E. coli*. Bakteri *E. coli* merupakan bakteri Gram negatif yang mempunyai lapisan peptidoglikan tipis (Salton, 1963) sehingga nanokitosan mampu untuk membunuh bakteri dengan memengaruhi *Outer membrane* (OM) dan *Inner membrane* (IM) bakteri yang menyebabkan kerusakan struktur, fungsi dan peningkatan permeabilitas membran *E. coli* (Li *et al.*, 2010). Jeon *et al.* (2014) menunjukkan bahwa pemberian mikropartikel kitosan pada bakteri *E. coli* O157: H7 memiliki aktivitas antimikrob yang dapat memengaruhi membran sel bakteri melalui interaksi dengan protein A di membran luar pada pH netral dan berakhir pada kematian sel bakteri.

Nanokitosan selain itu dapat menurunkan jumlah bakteri *Klebsiella* sp. yakni *Klebsiella pneumoniae*. Menurut Didenko *et al.* (2005), kitosan dapat berpengaruh terhadap bakteri *K. pneumoniae* karena menyebabkan ketebalan kapsul bakteri menipis dan terjadi fragmentasi lapisan luar pada dinding sel. Pada Tabel 3 ditunjukkan bahwa nanokitosan mampu

Tabel 3. Efektivitas nanokitosan terhadap bakteri Gram negatif dan positif penyebab endometritis\*

Jenis	Kontrol Positif (Log sel/mL)			Konsentrasi Nanokitosan (Log sel/mL)			Kontrol Negatif (Log sel/mL)
	Gentamisin	Penstrep Powder	Penstrep Inject	0,5%	1%	2%	
<b>Bakteri Gram Negatif</b>							
<i>E. coli</i>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	≥11,0±0,0 <sup>d</sup>	7,9±0,03 <sup>b</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	8,7±0,0 <sup>c</sup>
<i>Klebsiella</i> sp.	0,0±0,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	8,2±0,0 <sup>b</sup>	8,3±0,03 <sup>c</sup>	8,2±0,1 <sup>b</sup>	8,3±0,0 <sup>c</sup>
<i>P. aeruginosa</i>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	7,4±0,0 <sup>bc</sup>	7,4±0,04 <sup>c</sup>	7,3±0,0 <sup>b</sup>	8,5±0,0 <sup>d</sup>
<b>Bakteri Gram positif</b>							
<i>Bacillus</i> sp.	0,0±0,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	≥4,0±2,30 <sup>a</sup>	4,1±2,4 <sup>a</sup>	≥10,8±0,0 <sup>b</sup>
<i>S. aureus</i>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	>8,7±0,4 <sup>b</sup>	≥11,0±0,0 <sup>c</sup>	>8,8±0,3 <sup>b</sup>	≥11,0±0,0 <sup>c</sup>
<i>S. pyogenes</i>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	0,0±0,0 <sup>a</sup>	≥11,0±0,0 <sup>c</sup>	≥11,0±0,0 <sup>c</sup>	≥11,0±0,0 <sup>c</sup>	10,6±0,0 <sup>b</sup>

Keterangan: <sup>a,b,c,d</sup>, pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ); \*Data diulang sebanyak 4 kali, data yang ditampilkan merupakan hasil dari *total plate count* (TPC) yang telah di Logkan.

menurunkan jumlah koloni bakteri *P. aeruginosa*. Penelitian Tao *et al.* (2011) mengemukakan bahwa morfologi membran sel *P. aeruginosa* yang terpapar kitosan 300 mg/L selama 20 menit dapat mengalami kerusakan. Didenko *et al.* (2005) juga menyatakan bahwa kerusakan dinding sel pada bakteri dapat menyebabkan penurunan fungsi sel dan proses mitosis yang mengakibatkan kematian sel.

Pada Tabel 3 ditunjukkan bahwa nanokitosan mampu menurunkan jumlah koloni bakteri secara signifikan pada semua konsentrasi pada bakteri *Bacillus* sp. ( $P < 0,05$ ). *Bacillus* sp. merupakan bakteri Gram positif yang memiliki dinding sel terdiri atas lapisan peptidoglikan tebal yang dipenuhi asam teikoat bermuatan negatif karena adanya gugus fosfat (Vollmer *et al.*, 2008). Senyawa bermuatan negatif (protein dan glikoprotein) terdapat di permukaan sel *Bacillus* sp. berpotensi berinteraksi dengan molekul kitosan bermuatan positif sehingga meningkatkan permeabilitas membran, yang mengarah pada kebocoran zat intraseluler (Chung *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004).

Bakteri *S. pyogenes* merupakan bakteri Gram positif. Menurut Prochnow *et al.* (2016), bakteri Gram positif memiliki struktur dinding sel yang tebal sekitar 20-80 nanometer dan terdiri atas beberapa lapisan peptidoglikan. Bakteri *S. pyogenes* yang memiliki dinding lapisan peptidoglikan atau sel multilayer murein sehingga nanokitosan tidak bisa melakukan penetrasi ke dalam sel (Rafaat *et al.*, 2009).

Nanokitosan selain itu dapat menurunkan jumlah koloni bakteri *S. aureus*. Menurut Didenko *et al.* (2005) bahwa *Staphylococcus* dengan pemberian kitosan menghasilkan penampilan protoplas (bakteri tanpa dinding sel) yang mengakibatkan lapisan luar membran sitoplasma menjadi terfragmentasi. Pada Tabel 3 ditunjukkan bahwa aktivitas antibakteri kitosan dapat berbeda pada setiap spesies mikroba yang disebabkan oleh beragam kondisi lingkungan (Kong *et al.*, 2010).

## SIMPULAN

Pemberian nanokitosan sebagai antibakteri mampu menurunkan jumlah koloni bakteri Gram negatif (*E. coli*, *Klebsiella* sp. dan *P. aeruginosa*) dan Gram positif (*Bacillus* sp. dan *S. aureus*).

## SARAN

Dari hasil yang diperoleh pada penelitian ini, disarankan dilakukan uji efektivitas antibakteri nanokitosan terhadap penyembuhan endometritis pada sapi.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr.drh. Krido Brahmo Putro yang telah membantu dalam pengambilan sampel cairan uterus dan Peternakan Rakyat Kawasan Usaha Peternakan Cibungbulang, Kabupaten Bogor yang telah memberikan izin untuk pengambilan sampel cairan uterus.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. 2004. Recent advances on chitosan based micro and nanoparticles in drug delivery. *J Control Release* 100: 5-28.
- Aloys H, Korma SA, Alice TA, Chantal N, Ali AH, Abed SM, Ildephonse H. 2016. Microencapsulation by complex coacervation: methods, techniques, benefits, and applications - A Review. *American J Food Sci Nutr Res* 3: 188-192.
- Azawi OI. 2008. Postpartum uterine infection in cattle. *Anim Reprod Sci* 105: 187-208.
- Ball PJH, Peters AR. 2004. *Reproduction in cattle*. 3rd edition. Oxford (GB): Blackwell Publishing. Hlm. 124
- Balcerzak J, Kucharska M, Grucha<sup>3</sup>a B. 2013. Preparation of Micro and Nanostructures of Chitosan by Ultrasonic Coalescence of W/O Emulsion. *Prog Chem Appl Chitin Deriv* 18: 13-20.
- Calvo P, Remuñan-Lopez C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. 1997. Novel hydrophilic chitosan polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J Appl Polym Sci* 63: 125-132.
- Chung Y, Su Y, Chen C, Jia G, Wang H, Wu J. 2004. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharm Sin* 25: 932-936.

- Didenko LV, Gerasimenko DV, Konstantinova ND, Silkina TA, Avdienko ID, Bannikova GE, dan Varlamov VP. 2005. Ultrastructural study of chitosan effect on *Klebsiella* and *Staphylococci*. *Bull Exp Biol Med* 140(3): 360-365.
- DPKH Lampung (Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Lampung). 2012. *Buku statistik peternakan*. Lampung. Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Provinsi Lampung.
- Du WX, Olsen CW, Avena-bustillos RJ, Mchugh TH, Levin CE, Friedman M. 2009. Storage stability and antibacterial activity against *Escherichia coli* O157: H7 of carvacrol in edible apple ulms made by two different casting methods. *J Agri Food Chem* 56: 3082–3088.
- El-Sharif AA, Hussain MH. 2011. Chitosan-EDTA new combination is a promising candidate for treatment of bacterial and fungal infections. *Curr Microbiol* 62: 739-745.
- Esmaeili F, Heuking S, Junginger HE, dan Borchard G. 2010. Progress in chitosan-based vaccine delivery systems. *J Drug Del Sci Tech* 20: 53-61.
- Francolini I, Donelli G, Crisante F, Taresco V, Piozzi A. 2015. Antimicrobial polymers for anti biofilm medical devices: state of art and perspectives. *Adv Exp Med Biol* 831: 93-117.
- Goy RC, Britto D, Assis OBG. 2009. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros* 19: 241-247.
- Je J, Kim S. 2006. Chitosan derivatives killed bacteria by disrupting the outer and inner membrane. *J Agri Food Chem* 54: 6629-6633.
- Jeon SJ, Yeo WS, Galvao KN, Jeong KC. 2014. Underlying mechanism of antimicrobial activity of chitosan microparticles and implications for the treatment of infectious diseases. *PLoS ONE* 9: 92-723.
- Kasimanickam R, Duffield TF, Foster, RA, Gartley CG, Leslie KE, Walton JS, Johnson WH. 2004. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 62: 9-23.
- Kean T, Thanou M. 2010. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Adv Drug Deliv* 62: 3-11.
- Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. 2010. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *Int J Food Microbiol* 144: 51-63.
- LeBlanc SJ, Duffield T, Leslie K, Bateman K, Keefe G, Walton J, Johnson W. 2002. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis, and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J of Dairy Sci* 85: 2223-2236.
- Li X, Feng X, Yang S, Fu G, Wang T, Su Z. 2010. Chitosan kills *Escherichia coli* through damage to be of cell membrane mechanism. *Carbohydr Polym* 79(3): 493-499.
- Liu X, Yun L, Dong Z, Zhi L, Kang D. 2001. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *J of Appl Polym Sci* 79(7): 1324-1335.
- Liu GM, Cheng H, Nesbit JB, Su WJ, Cao MJ, Maleki SJ. 2010. Effects of boiling on the ige-binding properties of tropomyosin of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *J Food Sci* 75(1): T1-T5.
- Liu CJ, Wang YH, Yang ZH, Cao YG, Li DP, Liu WB, Zhang NS. 2013. Prevalence and major pathogen causes of dairy cows clinical endometritis in northeast china. *Asian J Anim Vet Adv* 8: 124-129.
- Luis E, Anton R, Kenneth AH, Duncan S, Peter L. 2011. Antimicrobial effect of chitosan nanoparticles on streptococcus mutans biofilm. *J Appl environ microb* 77: 3892-3895.
- Matica A, Menghiu G, Ostafe V. 2017. Antibacterial Properties of Chitin and Chitosans. *New Front in Chem Rev* 27: 39-54.
- Moges N, Regassa F, Yilma T, Unakal GC. 2013. Isolation and antimicrobial susceptibility of bacteria from dairy cows with clinical endometritis. *J Reprod Infertil* 4: 4-8.
- Murdiati TB. 1997. Pemakaian antibiotik dalam usaha peternakan. *Wartazoa* 6: 1-5.



- Park SI, Daeschel MA, Zhao Y. 2004. Functional properties of antimicrobial lysozyme chitosan composite films. *J Food Sci* 69: 215-221.
- Prochnow M, Clauson A, Hong M, Murphy J. 2016. Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. *Sci Reports* 6: 1-11.
- Raafat D, Kristine VB, Albert H, Hans GS. 2008. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Appl Environ Microb* 74: 3764-3773.
- Raafat D, Sahl HG. 2009. Chitosan and its antimicrobial potential a critical literature survey. *Microb Biotechnol* 2: 186-201.
- Rieggera BR, Baurera B, Mirzayeva A, Tovar GEM, Bach. 2018. A systematic approach of chitosan nanoparticle preparation via emulsion crosslinking as potential adsorbent in wastewater treatment. *Carbohydr Polym* 180: 46-54.
- Salton MRJ. 1963. The relationship between the nature of the cell wall and gram stain. *J Gen Microbiol* 30: 223-235.
- Seals RC, Matamoros I, Lewis GS. 2002. Relationship between postpartum changes in 13,14-dihydro-15-keto-PGF<sub>2</sub> concentrations in Holstein cows and their susceptibility to endometritis. *J Anim Sci* 80: 1068-1073.
- Shahidi F, Abuzaytoun R. 2005. Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, production, application, and health effects. *Adv Food Nutr* 49: 93-135.
- Singh D, Shashi A, Alok M, Kushal K. 2015. Advancement of Chitosan Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery of Antiulcer Drugs. *Int J Pharm Pharm Sci* 4: 505-518.
- Tao Y, Qian LH, Xie J. 2011. Effect of chitosan on membrane permeability and cell morphology of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Carbohydr Polym* 86: 969-974.
- Tiyaboonchai W. 2003. Chitosan Nanoparticles: A Promising System for Drug Delivery. *J Naresuan University* 11: 51-66.
- Vollmer W, Blanot D, Miguel A, Pedro de. 2008. Peptidoglycan structure and architecture. *Microbiol Rev* 32: 149-167.
- Wagener K., Prunner I., Pothmann H, Drillich M, Schulz EM. 2015. Diversity and health status specific fluctuations of intrauterine microbial communities in postpartum dairy cows. *Vet Microbiol* 175: 286-293
- Williams EJ, Fischer DP, Noakes DE, England GCW, Rycroft A, Dobson H, Sheldon IM. 2007. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology* 68: 549-559.
- Xing K, Chen XG, Liu CS, Cha DS, Park HJ. 2009. Oleoyl-chitosan nanoparticles inhibits *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by damaging the cell membrane and putative binding to extracellular or intracellular targets. *Int J Food Microbiol* 132: 127-133.
- Zhang W, Sun J, Ding W, Lin J, Tian T, Liu X, Shen X, Qian PY. 2015. Extracellular matrix-associated protein form an integral and dynamic system during *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Front Cell Infect Microbiol* 5: 1-10.
- Zhao LM, Shi LE, Zhang ZL, Chen JM, Shi DD, Yang J, Tang ZX. 2011. Preparation and application of chitosan nanoparticles and nanofibers. *Braz J Chem Eng* 28: 353-362.