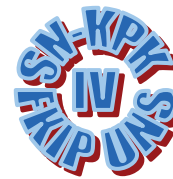


MAKALAH PENDAMPING : PARALEL B



SEMINAR NASIONAL KIMIA DAN PENDIDIKAN KIMIA IV
"Peran Riset dan Pembelajaran Kimia dalam Peningkatan Kompetensi
Profesional"

Program Studi Pendidikan Kimia Jurusan PMIPA FKIP UNS
Surakarta, 31 Maret 2012



PENGARUH DEASETILASI ULANG PADA PEMBUATAN KITOSAN TERHADAP DERAJAD DEASETILASI, BERAT MOLEKUL DAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI *KLEBSIELLA PNEUMONIA* DAN *STAPHYLOCOCCUSEPIDERMIDIS*

Endang Susilowati¹⁾, Cristin Dewi Wulansari¹⁾

1) Prodi Pendidikan Kimia Jurusan PMIPA FKIP UNS
Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta, e-mail: endwati@yahoo.co.id

Abstrak

Penelitian ini bertujuan mensintesis kitosan dari kitin limbah udang dan mempelajari pengaruh deasetilasi ulang terhadap derajat deasetilasi, berat molekul dan aktivitas antibakteri *Klebsiella Pneumonia* dan *StaphylococcusEpidermidis*. Sintesis kitosan dilakukan melalui proses deasetilasi dan deasetilasi ulang dari kitin limbah udang. Besarnya derajat deasetilasi dihitung berdasarkan *baselinea* sesuai metode Domzy dan Roberts dari spektra FTIR. Berat molekul kitosan ditentukan dengan metode viskosimetri dan berdasar pada persamaan Mark-Houwink. Adapun perlakuan deasetilasi dan deasetilasi ulang adalah kitosan A (waktu deasetilasi 1,5 jam), kitosan B (waktu deasetilasi ulang 1,5 jam), kitosan C (waktu deasetilasi ulang 3 jam), kitosan D (waktu deasetilasi ulang 4,5 jam), kitosan E (waktu deasetilasi ulang 6 jam), dan kitosan F (waktu deasetilasi 6 jam). Deasetilasi ulang dilakukan terhadap kitosan A. Uji aktivitas antibakteri kitosan terhadap bakteri *Klebsiella pneumonia* dan *StaphylococcusEpidermidis* dilakukan dengan metode difusi sumuran (*perforasi*).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tahapan deasetilasi ulang pada sintesis kitosan berpengaruh terhadap besarnya derajat deasetilasi, berat molekul dan aktivitas antibakteri pada bakteri *Klebsiella pneumonia* dan *Staphylococcus epidermidis*. Tahapan deasetilasi ulang dapat menurunkan berat molekul kitosan dan meningkatkan derajat deasetilasi. Derajat deasetilasi dan berat molekul kitosan A 65,07% dan 237,4 kDa kitosan B 74,23% dan 151,6 kDa, kitosan C 75,63% dan 111,7 kDa, kitosan D 76,56% dan 94,4 kDa, kitosan E 80,88% dan 92,9 kDa, dan kitosan F 67,52% dan 160 kDa. Aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Klebsiella pneumonia* adalah kitosan A 9,25 mm, kitosan B 9,57 mm, kitosan C 9,71 mm, kitosan D 9,82 mm, kitosan E 9,94 mm, dan kitosan F 9,49 mm, sedangkan aktivitas antibakteri pada bakteri *Staphylococcus epidermidis* adalah kitosan A 9,62 mm, kitosan B 9,53 mm, kitosan C 9,49 mm, kitosan D 9,46 mm, kitosan E 9,24 mm, dan kitosan F 9,49 mm.

Kata Kunci: *Kitosan, Deasetilasi ulang, derajat deasetilasi, berat molekul, antibakteri*

PENDAHULUAN

Pemanfaatan limbah udang menjadi material yang bernilai ekonomi di Indonesia belum dilakukan dengan maksimal. Padahal potensi limbah udang dari tahun ke tahun semakin meningkat berdasarkan potensi udang Indonesia rata-rata meningkat sebesar 7,4 % per tahun. Pada sisi lain kebutuhan obat-obatan, khususnya zat antimikroba untuk keperluan medis semakin meningkat.

Melalui teknologi yang tepat, maka limbah udang ini dapat diolah lebih lanjut menjadi produk yang bermanfaat yaitu kitosan. Beberapa riset yang dilakukan sebelumnya menunjukkan bahwa kitosan serta beberapa senyawa turunannya memiliki sifat antibakteri dan antifungi (Endang Susilowati, dkk, 2009, Gerasimenko, D.V., et al, 2004)

Sebagian besar limbah udang berasal dari kulit, kepala, dan ekornya. Kulit udang mengandung protein (25-40 %),

kalsium karbonat (45-50 %) dan kitin (15-20 %), tetapi besarnya kandungan komponen tersebut tergantung pada jenis udang. Kitin merupakan biopolimer alam paling melimpah kedua setelah selulosa. Senyawa kitin atau (α (1 - 4) - N-asetil - D-glukosamin) merupakan suatu senyawa turunan selulosa, dimana gugus hidroksil pada atom C-2 digantikan oleh gugus asetamido (Muzzarelli, 1986).

Kitin dapat diperoleh dari limbah kulit udang melalui beberapa tahapan proses yaitu deproteinasi, demineralisasi, dan depigmentasi. Deasetilasi kitin melalui proses hidrolisis basa menggunakan basa kuat dan pekat akan menghasilkan kitosan. Reaksi yang terjadi dapat dilihat pada Gambar 1 (Kumar, 2000).

Salah satu parameter penting yang mempengaruhi *performance* sifat-sifat kitosan adalah derajat deasetilasi (DD) dan berat molekul (BM). Besarnya DD ini sangat dipengaruhi oleh faktor-faktor seperti konsentrasi basa, temperatur, waktu, dan pengulangan deasetilasi selama pembentukan kitosan. Sementara itu BM kitosan dipengaruhi oleh sumber kitosan dan proses pembuatan kitosan. (Li et al., 1992). Pada penelitian ini dilakukan pembuatan kitosan dengan menggunakan variasi waktu pada pengulangan tahapan deasetilasi. Penggunaan variasi waktu tersebut diharapkan mampu meningkatkan derajat deasetilasi kitosan yang dihasilkan sehingga dapat meningkatkan nilai manfaat kitosan, khususnya manfaat kitosan sebagai antimikroba maupun antibakteri. Disamping itu proses deasetilasi ulang dimungkinkan terjadinya penurunan BM kitosan.

Kitosan dapat digunakan sebagai antimikroba yang aman bagi manusia karena senyawa ini merupakan polimer alami. Fakta di lapangan menunjukkan, penelitian-penelitian mengenai kitosan sangat menarik para ahli karena pemanfaatan kitosan yang semakin luas. Hal ini disebabkan karena kitosan bersifat biokompatibel, biodegradabel, tak beracun terhadap mamalia.

Untuk memperoleh derajat deasetilasi yang tinggi, dalam penelitian ini dilakukan sintesis kitosan melalui proses deasetilasi ulang dengan variasi waktu deasetilasi. Hasil deasetilasi ulang selanjutnya dihitung derajat deasetilasi (DD) berdasarkan spectra FTIR dan berat molekul (BM) berdasarkan persamaan Mark-Houwink. Pengaruh tahapan

deasetilasi ulang ini juga diamati terhadap aktivitas antibakterinya. Dengan asumsi bahwa tingginya DD menunjukkan peningkatan bagian aktif dari kitosan, maka DD juga berpengaruh terhadap aktivitas antibakterinya.

Salah satu bakteri gram positif yang merugikan manusia adalah *Klebsiella pneumoniae*. Penyakit yang ditimbulkan oleh bakteri tersebut antara lain bronco-pneumonia. *Klebsiella pneumoniae* terdapat dalam saluran pernafasan dan feses sekitar 5 % orang normal dan dapat menyebabkan pneumonia bacterial (Jawetz et al, 1996). Sedangkan salah satu bakteri gram negatif adalah *Staphylococcus Epidermidis*. *Staphylococcus epidermidis* yang merupakan bakteri flora normal, pada dasarnya tidak invasif dan jarang menyebabkan pernanahan. Tetapi apabila habitat normalnya terganggu maka ia dapat menimbulkan penyakit melalui kemampuannya berbiak dan menyebar luas dalam jaringan serta toksin yang dihasilkannya. Daerah-daerah yang sering terinfeksi *Staphylococcus epidermidis* adalah protesa ortopedik dan sistem kardiovaskular. (Jawetz et al, 1996).

Berdasarkan uraian di atas, maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh tahapan deasetilasi ulang pada sintesis kitosan dari limbah udang terhadap berat molekul, derajat deasetilasi, dan aktivitas antibakteri *Klebsiella pneumoni* (bakteri gram positif) dan *Staphylococcus epidermidis* (bakteri gram negatif).

METODOLOGI PENELITIAN

Alat yang digunakan

Alat-alat yang dipakai dalam penelitian ini terdiri dari: autoclave, peralatan gelas, pH meter, ayakan, Blander, viscosimeter, oven, Magnitik stirrer dengan hot plate, *waterbath*, pipet mikro, cawan petri, kurs porselin, sentrifuge, dan spektrometer FTIR model Buck-M500, peralatan uji antibakteri metode difusi.

Bahan yang digunakan

Limbah udang kering diambil dari PT Neptune Chemical Tbk., NaOH (Merck), HCl (Merck), CH₃COOH (Merck), akuades, Kloramfenicol, bakteri *K.pneumonia*, Muller Hinton Agar, Nutrien Agar, kertas saring.

a. Pembuatan kitosan dari limbah udang

Limbah udang kering dihaluskan dan diayak dengan ukuran ayakan 80 - 100 mesh. Ada 3 tahap proses perolehan kitosan yaitu deproteinasi, demineralisasi dan deasetilasi. Tahap deproteinasi dilakukan dengan merendam kulit udang dalam NaOH 3,5% (w/v) dengan perbandingan padatan/cairan 1: 10 pada temperatur 65°C selama 2 jam dengan pengadukan. Selanjutnya dilakukan proses demineralisasi dengan merendam padatan dalam larutan HCl 1M (1: 10) selama 30 menit pada temperatur kamar dengan perbandingan padatan/pelarut: 1/15 (w/v), kemudian dicuci sampai netral dan dikeringkan. Selanjutnya adalah proses deasetilasi yang dilakukan dengan melarutkan sampel dalam NaOH 50% (w/v) dengan komposisi padatan/pelarut: 1/10 (w/v). Campuran ini dan diaduk selama 90 menit dalam autoclave, dengan tekanan 115 psi, pada suhu 120°C, kemudian menyaring endapan dan mencuci endapan dengan akuades sampai pH netral. Selanjutnya endapan yang terbentuk dalam dikeringkan oven selama 24 jam pada suhu 60°C. Sampel yang diperoleh diberi kode A. Deasetilasi juga dilakukan juga dalam waktu 6 jam yang selanjutnya diberi kode F

b. Sintesis kitosan dengan variasi waktu tahapan deasetilasi ulang

Proses deasetilasi ulang dilakukan terhadap kitosan A dengan waktu bervariasi yaitu 1,5; 3,0; 4,5 dan 6 jam. Selanjutnya sampel diberi kode B, C, D, dan E.

c. Penentuan DD kitosan

Karakterisasi Kitosan dilakukan dengan menghitung rendemen, derajat deasetilasi dan analisis gugus fungsi menggunakan FTIR. Derajat deasetilasi diperoleh berdasarkan spektra FTIR kemudian dari spektra DD dihitung menggunakan garis *baseline a* sesuai Domszy dan Robert (Khan, 2002). Yaitu :

$$\%DD = 100 - [(A_{1655} / A_{3450}) \times 100 / 1,33]$$

d. Penentuan berat molekul kitosan

Berat molekul kitosan ditentukan berdasarkan persamaan Mark-Houwink yang berkaitan dengan viskositas intrinsik $[\eta]$ mempunyai konstanta viskometrik empirik $K=1,81 \times 10^{-3} \text{cm}^3/\text{g}$ dan $\alpha=0,93$.

$$\text{Persamaannya adalah: } [\eta] = K M^\alpha$$

(Maghami and Roberts, 1988)

e. Uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi

Bakteri *K. Pneumonia* (bakteri gram positif) dan *S. epidermidis* (bakteri gram negatif) yang telah diregenerasi sebanyak 1-2 oshe diinokulasi dalam media cair (NAB) selama 24 jam pada incubator shaker. Setelah itu dengan perbandingan tertentu sejumlah media padat (MHA) dan kultur dalam media cair dicampur ke dalam cawan petri. Setelah agar memadat dibuat sumuran dengan diameter 6mm. Ke dalam lubang tersebut masing-masing dimasukkan kontrol negatif berupa larutan asam asetat 1%, sampel kitosan 1% A, B, C, D, E dan F dan kontrol positif berupa kloramfenikol 0,1% masing-masing sebanyak 20 μl kemudian diinkubasi dalam Holt Colt selama 24 jam pada suhu 37°C. Kemudian diukur zona bening dengan

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kitosan bisa diperoleh melalui tahapan isolasi kitin dari limbah udang melalui demineralisasi dan deproteinasi kemudian dilanjutkan dengan tahapan deasetilasi dari kitin sehingga dihasilkan Kualitas kitosan yang dihasilkan dapat dilihat dari nilai derajat deasetilasi (DD). Semakin besar derajat deasetilasi, maka kitosan memiliki kualitas semakin baik. Kitosan komersial biasanya memiliki derajat deasetilasi lebih besar dari 70 %.

Pada penelitian ini dilakukan pembuatan kitosan dengan mempelajari pengaruh tahapan deasetilasi terhadap besarnya DD, berat molekul dan aktivitas antibakteri *K. Pneumonia* (bakteri gram positif) dan *S. epidermidis* (bakteri gram negatif). Tahapan deasetilasi ulang dilakukan dengan variasi waktu deasetilasi dari kitosan hasil deasetilasi yang pertama. Adapun pengaruh tahapan deasetilasi ulang kitosan terhadap nilai DD dan berat molekul (BM) dapat dilihat pada Tabel 1. Derajat deasetilasi ditentukan berdasarkan spektra FTIR yang terlihat pada Gambar 1 dan Gambar 2.

Dari Tabel 1 dapat dilihat bahwa makin lama waktu deasetilasi ulang makin besar nilai DD dan makin rendah BM kitosan yang diperoleh. Jika dibandingkan kitosan D dan F dimana sama-sama membutuhkan waktu deasetilasi 6 jam, maka untuk proses deasetilasi yang dilakukan 2 tahap (kitosan D) diperoleh produk kitosan dengan DD yang lebih besar dibanding dengan proses deasetilasi 1 tahap. Pengaruh deasetilasi ulang terhadap penurunan berat molekul cukup signifikan.

Hal ini berarti bahwa proses deasetilasi ulang disertai proses depolimerisasi.

Perubahan spektra FTIR kitosan yang disebabkan oleh variasi waktu terlihat pada Gambar 2 dan Gambar 3. Dari Gambar 2 dan Gambar 3 menunjukkan terjadinya penurunan intensitas dan pergeseran ke arah bilangan gelombang yang lebih kecil pada puncak serapan sekitar $1658,78\text{ cm}^{-1}$ (Amida I). Kenaikan intensitas terjadi pada puncak serapan sekitar $1597,06\text{ cm}^{-1}$ ($-\text{NH}_2$) seiring dengan meningkatnya DD kitosan. Serapan sekitar $3441,01\text{ cm}^{-1}$ terjadi penyempitan puncak dan pergeseran ke arah bilangan gelombang lebih besar dengan meningkatnya DD kitosan di atas 65%. Sebagaimana telah diketahui bahwa kitosan A memiliki DD sebesar 65,07% dan kitosan F memiliki DD sebesar 67,52%. Hal ini disebabkan semakin lama waktu reaksi deasetilasi kitin, gugus asetil yang tersubstitusi menjadi gugus amina semakin banyak sehingga DD kitosan semakin tinggi. Namun dalam penelitian ini, tampak bahwa peningkatan DD hanya sebesar 2,5%. Hal ini bisa disebabkan oleh terbatasnya jumlah partikel NaOH dalam larutan. Ketika NaOH sudah habis bereaksi, meskipun waktudeasetilasi diperpanjang tidak akan terjadi peningkatan DD. Dari Tabel 1 terlihat bahwa tahapan redeasetilasi mampu meningkatkan DD yang cukup signifikan. Semakin lama waktu redeasetilasi, semakin besar peningkatan DDnya.

Derajat deasetilasi adalah suatu parameter mutu yang menunjukkan gugus asetil yang dapat dihilangkan dari rendemen kitosan. Semakin tinggi derajat deasetilasi kitosan, maka gugus asetil yang terdapat dalam kitosan tersebut semakin sedikit. Derajat deasetilasi yang tinggi menunjukkan bahwa kitosan yang dihasilkan telah terdeasetilasi hampir sempurna. Semakin tinggi derajat deasetilasi maka gugus asetil kitosan semakin rendah sehingga interaksi antar ion dan ikatan hidrogennya akan semakin kuat. Pelepasan gugus asetil dari kitosan menyebabkan kitosan bermuatan positif yang mampu mengikat senyawa bermuatan negatif seperti protein, anion polisakarida membentuk ion netral.

Kitosan yang dihasilkan diuji aktivitas antibakterinya dengan melarutkannya ke dalam larutan asam asetat 1%. Larutan asam asetat ini juga berfungsi sebagai kontrol negatif dan kloramfenikol sebagai kontrol positif. Hasil

uji aktivitas antibakteri yang dinyatakan dalam zone hambat dari kitosan pada bakteri *K.Pneumonia* dan *S. Epidermidis* dapat dilihat pada Tabel 2.

Dari Tabel 2 terlihat bahwa zona hambat dari kitosan pada bakteri *S. epidermidis* berkurang sedikit dengan bertambahnya derajat deasetilasi. Sementara itu untuk zone hambat terhadap bakteri gram negatif *K.Pneumonia* semakin bertambah seiring bertambahnya derajat deasetilasi kitosan. Zone hambat kitosan hasil sintesis pada penelitian ini dapat dikategorikan kuat karena nilainya lebih tinggi dari 8 mm. Kecenderungan meningkatnya aktivitas antibakteri gram negatif *K.Pneumonia* dengan bertambahnya DD merupakan konsekuensi logis dari makin banyaknya gugus aktif amina ($-\text{NH}_2$).

Kitosan digunakan sebagai antibakteri karena mengandung gugus polikation bermuatan positif yaitu NH_3^+ bebas yang dapat mengikat muatan negatif pada permukaan sel bakteri dan membawa efek antibakteri. Sifat kationik pada kitosan dimungkinkan disebabkan karena adanya asam asetat yang mengandung gugus hidroksil. Mekanisme kerja dari antibakteri kitosan yang bersifat kationik pada bakteri adalah dengan cara merusak struktur membran/dinding sel pada bakteri. Karena bakteri tersebut salah satu bakteri gram negatif maka *K.Pneumonia* memiliki struktur dinding sel yang tipis, lapisan luar membran yang mengandung lipopolisakarida dan protein, dan terdapat lapisan peptidoglikan (dinding sel) dan membran sel yang terdiri dari lapisan lemak, protein trans-membran dan *inner/outer* membran protein. Muatan negatif dari lipopolisakarida berikatan dengan muatan positif gugus amino pada kitosan sehingga memblokir aliran nutrisi pada bakteri yang pada akhirnya menyebabkan kematian sel.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tahapan redeasetilasi pada sintesis kitosan berpengaruh terhadap besarnya derajat deasetilasi dan aktivitas antibakteri pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella thypi*. Tahapan deasetilasi ulang dapat menurunkan berat molekul kitosan dan meningkatkan derajat deasetilasi. Derajat deasetilasi dan berat molekul kitosan A 65,07% dan 237,4 kDa kitosan B 74,23% dan 151,6 kDa, kitosan C 75,63% dan 111,7 kDa, kitosan D 76,56% dan 94,4 kDa, kitosan E 80,88% dan 92,9 kDa, dan

kitosan F 67,52% dan 160 kDa. Aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Klebsiella pneumonia* adalah kitosan A 9,25 mm, kitosan B 9,57 mm, kitosan C 9,71 mm, kitosan D 9,82 mm, kitosan E 9,94 mm, dan kitosan F 9,49 mm, sedangkan aktivitas antibakteri pada bakteri *Staphylococcus epidermidis* adalah kitosan A 9,62 mm, kitosan B 9,53 mm, kitosan C 9,49 mm, kitosan D 9,46 mm, kitosan E 9,24 mm, dan kitosan F 9,49 mm.

DAFTAR RUJUKAN

- [1] Endang Susilowati, Maryani, M. Masykuri, 2009, *Modifikasi Gugus Samping Aldehid dan Ammonium Kuaterner pada Khitosan dari Limbah Udang sebagai Zat Antibakteri Larut Air untuk Aplikasi Medis*, Laporan Penelitian Hibah Bersaing, LPPM UNS.
- [2] Gerasimenko, D.V.; Avdienko, I.D.; Bannikova, G.E.; Zueva, O.Y.; Varlamov, V.P. 2004. *Appl. Biochem. Microbiol.* 40(3), 301.
- [3] Jawetz et al. 1996. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran (EGC).
- [4] Khan T. A., Peh K. K., and Ching H.S., 2002, Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods, *J Pharm Pharmaceut Sci* 5(3):205-212.
- [5] Kumar M.N.V.R, 2000, A review of chitin and chitosan applications, *Reactive & Functional Polymers*, 46, 1–27
- [6] Li J, Revol J.F and Marchessault R.H., 1997, Effect of degree of deacetylation of chitin on the properties of chitin crystallites, *J Appl Polym Sci* 65(2):373-80
- [7] Maghami GG and Roberts GAF, 1988, Evaluation of the viscometric constants for chitosan, *Macromol Chem*, 189, 195-200
- [8] Muzzarelli, R.A.A.; Jeuniaux, C.; Gooday, G.W. 1986. *Chitin in Nature and Technology*, New York: Plenum.

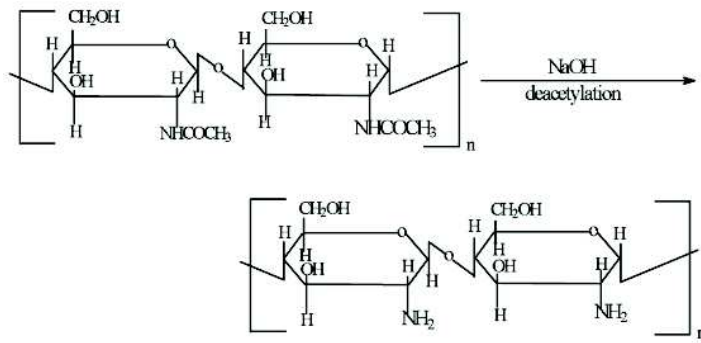
LAMPIRAN

Tabel 1. Pengaruh deasetilasi ulang kitosan terhadap nilai DD dan BM

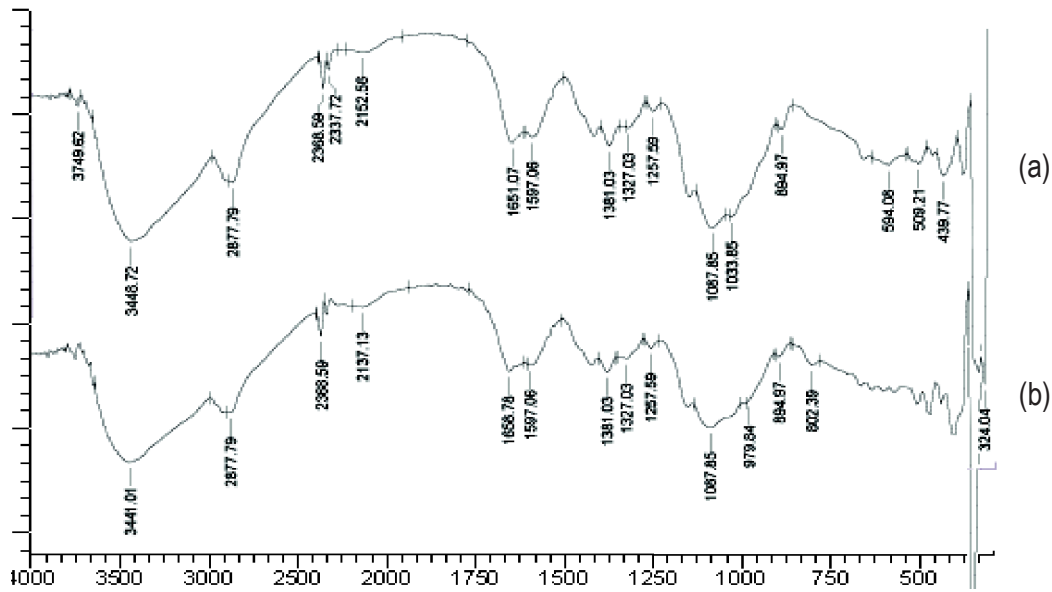
Sampel	Waktu Deasetilasi (jam)	Waktu deasetilasi ulang (jam)	DD	BM
Kitosan A	1,5	0	65,07	237,4
Kitosan B	1,5	1,5	74,23	151,6
Kitosan C	1,5	3	75,63	111,7
Kitosan D	1,5	4,5	76,56	94,4
Kitosan E	1,5	6	80,88	92,9
Kitosan F	6	0	67,52	160,6

Tabel 2. Zona hambat kitosan terhadap bakteri uji

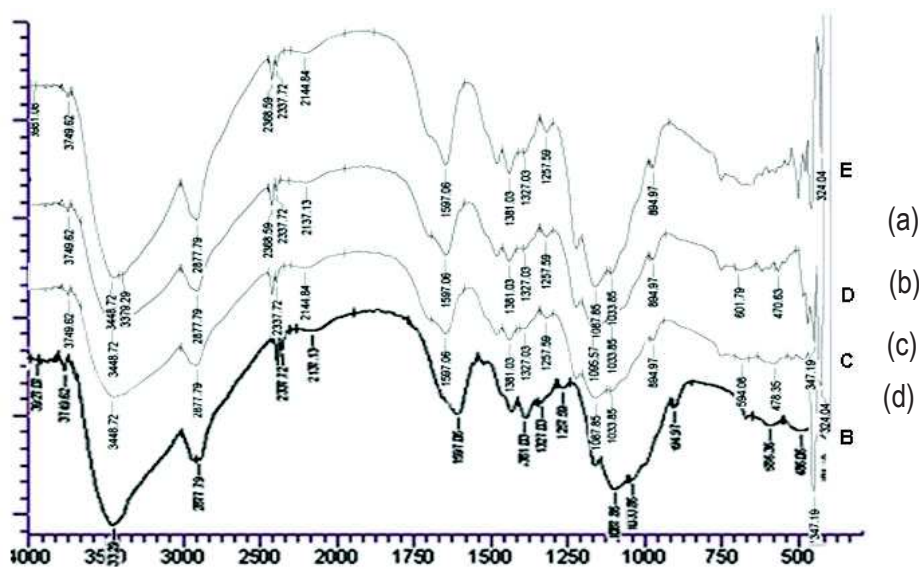
Sampel	Zona hambat (mm)	
	<i>K. pneumonia</i>	<i>S. epidermidis</i>
Asam asetat 1 %	0	0
Kitosan A	9,2488	9,6188
Kitosan B	9,5711	9,53
Kitosan C	9,7133	9,4944
Kitosan D	9,8255	9,4644
Kitosan E	9,9366	9,2444
Kitosan F	9,4955	9,4911
Kloramfenikol 0,1 %	16,9	16,6



Gambar 1. Reaksi deasetilasi kitin



Gambar 2. Spectra FTIR (a) kitosan A dan (b) kitosan F



Gambar 3. Spektra FTIR (a) kitosan E, (b) kitosan D, (c) kitosan C dan (d) kitosan B

Tanya Jawab :

Nama Penanya : Eli Rohaeti

Pertanyaan :

1. Jelaskan DD yang prosesnya diulang dibanding yang tidak diulang ?
2. Mengapa gram negatif lebih baik?
3. Komponen struktur gram positif dan negatif apa?

Jawaban :

1. DD yang diulang lebih baik karena menggunakan NaOH yang basa, sehingga difusi ke struktur kitosan lebih baik.
2. Karena berkaitan dengan struktur membran sel bakteri dan gugus amika dari kitosan.
3. Struktur gram positif dan negatif berbeda, masih dalam kajian peneliti.