



PROSIDING

SEMINAR NASIONAL KIMIA DAN PENDIDIKAN KIMIA III

"Teori dan Aplikasi Sains dalam Isu Globalisasi Lingkungan, Profesionalisasi Pembelajaran dan Kewirausahaan"

Program Studi Pendidikan Kimia Jurusan PMIPA FKIP UNS

Surakarta, 7 Mei 2011



MAKALAH PENDAMPING

KIMIA ANORGANIK
(Kode : D-01)

ISBN : 978-979-1533-85-0

SINTESIS KITOSAN HIDROLISAT DARI LIMBAH UDANG PUTIH (*Penaeus Merguensis*) SECARA ENZIMATIS MENGGUNAKAN PAPANIN DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI TERHADAP *Klebsiella Pneumonia*

Endang Susilowati¹⁾, Maryani²⁾, M.Masykuri¹⁾, Arista Novia Dewi¹⁾

1) Program Studi Pendidikan Kimia PMIPA FKIP UNS

2) Lab Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UNS

Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta, e-mail: endwati@yahoo.co.id

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mensintesis kitosan Hidrolisat dari limbah udang putih (*Penaeus merguensis*) dan menguji aktivitas antibakteri kitosan Hidrolisat terhadap *Klebsiella Pneumonia*. Sintesis kitosan hidrolisat dilakukan melalui proses deproteinasi, demineralisasi, deasetilasi terhadap limbah udang putih (*Penaeus Merguensis*) untuk menghasilkan kitosan. Selanjutnya dilakukan hidrolisis kitosan secara enzimatis menggunakan papain. Karakterisasi terhadap kitosan Hidrolisat dilakukan meliputi berat molekul dengan metode viskometri, derajat deasetilasi dan gugus fungsi menggunakan metode spektroskopi FTIR. Uji aktivitas antibakteri kitosan Hidrolisat terhadap *Klebsiella Pneumonia* dilakukan menggunakan metode difusi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kitosan hidrolisat dapat disintesis dari limbah udang putih melalui proses deproteinasi, demineralisasi, dan deasetilasi dan hidrolisis enzimatis dengan papain. Kitosan Hidrolisat yang dihasilkan memiliki berat molekul 339,625 kDa, derajat deasetilasi 83,71% dan gugus fungsinya dapat dibuktikan dari spektra hasil analisis FTIR. Kitosan Hidrolisat memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Klebsiella Pneumonia* yang cukup baik yaitu pada konsentrasi 0,4%; 0,6 %; 0,8 % masing-masing memiliki daya hambat 9,88 mm, 10,97 mm dan 12,52 mm.

Kata Kunci: Limbah udang, kitosan Hidrolisat, papain, aktivitas antibakteri

PENDAHULUAN

Potensi produksi perikanan di Indonesia dari tahun ke tahun terus meningkat. Dari aspek pemanfaatan limbah perikanan, limbah udang memiliki potensi besar untuk diolah lebih lanjut karena jumlahnya yang cukup besar. Pada sisi lain kebutuhan obat-obatan, khususnya zat antimikroba untuk keperluan medis semakin meningkat. Melalui teknologi yang tepat, potensi limbah udang ini dapat diolah lebih lanjut menjadi kitosan. Beberapa riset yang dilakukan sebelumnya menunjukkan bahwa kitosan serta beberapa senyawa turunannya memiliki sifat antimikroba (antibakteri dan antifungi) (4,11). Aktivitas antimikroba kitosan pada bakteri dan

fungi cukup bervariasi, terhadap jamur *Botrytis cinerea* dan *Fusarium oxysporum* kitosan memiliki aktivitas yang tinggi (MIC10 ppm) (12), demikian pula terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Micrococcus luteus*, memiliki MIC 20 ppm (10), namun terhadap bakteri-bakteri lain, *Agrobacterium tumefaciens* dan *Agrobacterium tumefaciens* aktivitasnya menjadi sangat rendah masing-masing dengan MIC sebesar 100 ppm dan 200 ppm. Karena itu diperlukan riset lanjut untuk meningkatkan aktivitas antimikroba kitosan ini.

Salah satu solusi untuk meningkatkan aktivitas bakteri kitosan di atas adalah dengan melakukan pemecahan rantai kitosan menjadi

kitosan hidrolisat. Beberapa penelitian awal yang mendasari penelitian ini antara lain Uchida (13) yang menggunakan enzim *Bacillus chitosanase* sebagai agen reaksi hidrolisis kitosan dan menghasilkan peningkatan aktivitas antifungi, Kendra dan Hadwiger (9) memisahkan oligomer kitosan dengan metode kolom pemisah *Fractogel*, serta Hirano dan Nagano (5) yang menemukan bahwa kitosan hidrolisat lebih efektif menghambat pertumbuhan jamur *phytopathogenic*. Semua penelitian tersebut memberi dasar pijakan kuat mengenai peningkatan aktivitas antibakteri pada kitosan hidrolisat.

Kitosan hidrolisat dapat dihasilkan dengan iradiasi *sonik*, *hydrodynamic shearing*, hidrolisis secara kimiawi dan enzimatis. Degradasi kitosan secara enzimatis adalah cara yang lebih baik untuk mendapatkan oligomer kitosan dengan derajat polimerisasi yang lebih rendah. Beberapa tahun belakangan banyak studi mengenai berbagai enzim yang berbeda untuk mendegradasi kitosan. Aiba (2,3) menghidrolisis kitosan yang terdeasetilasi sebagian menggunakan kitinase dan lisozim. Hidrolisis kitosan juga telah dilaporkan menggunakan berbagai jenis enzim, yaitu glikanase, protease, lipase, dan tannase, yang didapatkan dari berbagai bakteri, fungi, mamalia, dan tanaman, dan juga menggunakan papain dari tanaman untuk depolimerisasi kitosan. (14)

Kumar *et al*, (7) menyebutkan bahwa kitosan hidrolisat yang memiliki kisaran berat 5 sampai 10 kDa merupakan antibakteri, antijamur, hipopolidemik yang kuat. Salah satu bakteri yang merugikan adalah *Klebsiella pneumonia* bakteri ini merupakan bakteri gram negatif yang menyebabkan bronkopneumonia dan pneumonia serta merupakan bakteri patogen kedua setelah *E.coli* untuk saluran kemih (6). Pada penelitian ini dilakukan sintesis kitosan hidrolisat dari limbah udang putih (*Penaeus Merquinesis*) sebagai

alternatif penyediaan senyawa antibakteri yang potensial dan aman. Sampai saat ini aktivitas antibakteri kitosan hidrolisat masih menjadi hal yang menarik untuk diteliti.

METODE PENELITIAN

1. 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

2. Bahan yang digunakan

limbah udang putih dari pasar tradisional, NaOH (Merck), HCl, CH₃COOH (Merck), enzim papain (Merck), Larutan Buffer Asetat(Merck), Kloramfenicol, *bakteri K.pneumonia*, *Muller Hinton Agar*, *Nutrien Agar*, kertas saring.

3. Cara Penelitian

a. Pembuatan Kitosan

Bahan baku berasal dari limbah udang putih dari pasar tadisional di Surakata. Limbah udang dicuci dan dikeringkan. Selanjutnya di haluskan 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. Proses terakhir adalah deasetilasi 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.

b. Sintesis Kitosan hidrolisat

Membuat larutan kitosan 5 gr/l dalam buffer asetat ($\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$) pH 4,5. Membuat larutan enzim papain dengan konsentrasi 2 gr/l. Mencampur larutan kitosan dan enzim papain dengan perbandingan 4:1 kemudian membiarkan pada suhu kamar selama 20 jam. Larutan kitosan yang telah terdegradasi kemudian dimasukkan dalam autoklaf pada suhu 100°C selama 1 jam dan menyimpan pada suhu 4°C. Selanjutnya Kitosan hidrolisat dicuci dengan aquades hingga pH netral dan dikeringkan pada suhu 40°C.

c. Karakterisasi kitosan dan kitosan hidrolisat

Karakterisasi produk kitosan meliputi rendemen, kadar air, kadar abu, berat molekul, daya ikat air, daya ikat lemak, kelarutan, viskositas, derajat polimerisasi, derajat deasetilasi, dan struktur menggunakan FTIR. Karakterisasi Kitosan hidrolisat dilakukan dengan menghitung rendemen, berat molekul, derajat polimerisasi, derajat deasetilasi, dan analisis gugus fungsi menggunakan FTIR.

d. Uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi

Bakteri *K.pneumonia* 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 hidrolisat dengan variasi konsentrasi 0,4%, 0,6% dan 0,8%, 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 jangka sorong.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kitosan dari limbah udang putih (*Penaeus merguensis*) dibuat melalui proses deproteinasi, demineralisasi dan deasetilasi diperoleh rendemen 10 %. Karakter fisik dan kimia dari kitosan hasil sintesis dapat dilihat pada Tabel 1. Dari Tabel 1 terlihat bahwa kitosan hasil sintesis menunjukkan karakter yang cukup baik ditinjau dari kadar air, kadar abu, viskositas, daya ikat air dan daya ikat lemak. Sementara itu dari sifat kimianya kitosan yang dihasilkan memiliki derajat deasetilasi yang tinggi yaitu 82,72 % dengan berat molekul 376,930 kDa.

Dari aspek struktur kitosan hasil sintesis bisa bisa diyakinkan melalui analisis gugus fungsi yaitu dengan munculnya beberapa puncak khas yang menunjukkan ciri spesifik struktur kitosan seperti pada Gambar 1. Misalnya pada puncak 1627.92 cm^{-1} yang menunjukkan adanya gugus amina, puncak 1658.78 cm^{-1} yang menunjukkan adanya gugus karbonil, puncak 3448.72 cm^{-1} yang menunjukkan adanya gugus alkohol dan beberapa puncak serapan lain yang memperkuat adanya struktur kitosan pada sampel yang diuji.

Pembentukan Kitosan hidrolisat pada penelitian ini melalui reaksi secara enzimatis. Kitosan hidrolisat dibentuk melalui reaksi hidrolisis kitosan menggunakan enzim papain. Rendemen dari hidrolisis enzimatis kitosan sebesar 60%, dengan berat molekul rata-rata 339,625 kDa. Ini berarti bahwa proses hidrolisis secara enzimatis dengan enzim papain telah mereduksi berat molekul rata-rata sebesar 37,305 kDa atau

memotong rata-rata monomer sebanyak 232 unit glukosamina. Dari aspek struktur seperti ditunjukkan pada Gambar 2, spektra FTIR Kitosan hidrolisat tidak berbeda dengan kitosan, yaitu dengan munculnya puncak pada $1627,92\text{ cm}^{-1}$, $1658,78\text{ cm}^{-1}$ dan $3441,01\text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan adanya gugus amina, karbonil dan alkohol. Kesamaan ini disebabkan karena pada dasarnya proses hidrolisis hanya berupa pemecahan rantai makromolekul tanpa terjadi modifikasi gugus fungsinya.

Uji antibakteri Kitosan hidrolisat terhadap bakteri *K. Pneumonia* dilakukan dengan menggunakan metode difusi. Sebagai kontrol negatif digunakan larutan asam asetat 1% dan kloramfenikol 0,1 % sebagai kontrol positif. Hasil uji antibakteri kitosan hidrolisat terhadap bakteri *K. Pnemunia* yang dinyatakan dalam jarak zone bening dapat dilihat pada Gambar 3.

Sementara itu nilai zone hambat dapat dilihat pada Tabel 3. Berdasarkan uji aktivitas antibakteri, kitosan hidrolisat memiliki daya hambat tergolong kuat (lebih dari 8 mm) pada rentang konsentrasi 0,4 % sampai 0,8 %.

Menurut Elganjar dalam Maratus S (8) dikatakan bahwa kekuatan antibakteri digolongkan menjadi 3 yaitu kuat jika menghasilkan diameter zona hambat lebih dari 8 mm, aktivitas sedang jika menghasilkan diameter zona hambat 7-8 mm, dan aktivitas lemah jika memiliki diameter zona hambat kurang dari 7 mm. Pada konsentrasi yang sama 0,8%, maka kitosan hidrolisat memiliki aktivitas lebih tinggi dibandingkan dengan kitosan. Dengan daya hambat yang kuat terhadap bakteri *K. Pnemonia* ini, maka kitosan memiliki potensi sebagai material anti bakteri yang aman bagi kesehatan.

Kitosan Hidrolisat dapat 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 hidrolisat dimungkinkan disebabkan karena adanya asam asetat yang mengandung gugus hidroksil. Mekanisme kerja dari antibakteri kitosan hidrolisat yang bersifat kationik pada bakteri *K.pneumonia* 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 hidrolisat, sehingga memblokir aliran nutrisi pada bakteri yang pada akhirnya menyebabkan kematian sel. Menurut Ariyanti & Yusro (1), semakin kecil ukuran kitosan (berat molekul semakin rendah), dan semakin elektronegatif bakteri gram negatif, pembentukan ikatan dan agegasi semakin selektif serta pemblokiran nutrisi semakin baik dan kematian sel semakin cepat.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kitosan hidrolisat dapat disintesis dari limbah udang putih melalui proses deproteinasi, demineralisasi, dan deasetilasi dan hidrolisis enzimatis dengan papain. Kitosan Hidrolisat memiliki berat molekul 339,625 kDa, derajat deasetilasi 83,71% dan gugus fungsinya dapat dibuktikan dari spectra hasil analisis FTIR. Kitosan Hidrolisat memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Klebsiella Pneumonia* yang cukup baik yaitu pada konsentrasi 0,4%; 0,6 %; 0,8 % masing-masing memiliki daya hambat 9,88 mm, 10,97 mm dan 12,52 mm.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Ariyanti S Dewi dan Yusro Nuri F. 2006. *Kitosan Oligosakarida :Produksi dan Potensinya Sebagai Antibakteri*. Squalen Vol. 1 No 1: 29-33
- [2] Aiba, S., (1994a), Preparation of N-acetylchitooligosaccharides by hydrolysis of chitosan with chitinase followed by N-acetylation, *Carbohydrates Research*, 265, 323-328.
- [3] Aiba, S., (1994b), Preparation of N-acetylchitooligosaccharides from lysozymic hydrolysates of partially N-acetylated chitosan, *Carbohydrates Research*, 261, 297-306
- [4] Gerasimenko, D.V.; Avdienko, I.D.; Bannikova, G.E.; Zueva, O.Y.; Varlamov, V.P. 2004. *Appl. Biochem. Microbiol.* 40(3), 301.
- [5] Hirano, S., and N. Nagao. 1989. Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme, and chitinase on the growth of several phytopathogens. *Agric. Biol. Chem* 53:3065 – 3066.
- [6] Jawetz *et al.* 1996. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran (EGC).
- [7] Kumar, B.A.V, Tharanathan, N. 2007. Low Molecular Weight Chitosans Preparation with the Aid of Pepsin, Characterization, and Its Bacterial Activity. *Biomacromolecules*. 8. 566-572
- [8] Maratus Solichah. 2009. *Identifikasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri dari Daun Secang (Caesalpinia Sappan (L))*. F. MIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta.
- [9] Kendra, D.F., and L.A. Hadwiger. 1984. Characterisation of the smallest chitosan oligomer that is maximally anti fungal to *Fusarium solani* and elicits pisat information in *Pisum sativum*. *Exp. Mycol.* 8:276 - 281.
- [10] Li, Z.; Liu, X.; Zhuang, X.; Guan, Y.; Yao, K. 2002. *J. Appl. Polym. Sci.* 84, 2049.
- [11] Liu, X.F.; Guan, Y.L.; Yang, D.Z.; Li, Z.; Yao, K.D. 2001 *J. Appl. Polym. Sci.* 79, 1324.
- [12] Muzzarelli, R.A.A. 1986. *Chitin*. Faculty of Medicine University of Ancona. Italy. Pergamon Press. 81 –87.
- [13] Uchida, Y., M. Izume, and A. Ohtakara. 1989. Preparation of chitosan oligomers with purified chitosanase and its application, p.373 - 382. In G. Skjök-Brök, T. Anthonsen, and P. Sandford (ed.), *Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications*. Elsevier Applied Science, London, United Kingdom.
- [14] Muzzarelli, R.A.A., M.Tomasetti dan P. Ilari, (1995), *Depolymerization of chitosan with the aid of papain*, *Enzyme and Microbial Technology*, 16, 110-114.

TANYA JAWAB

Nama Penanya : **Suherman**

Nama Pemakalah : **Endang Susilowati**

Pertanyaan :

1. Bagaimana cara membuat atosan menjadi 83 % ?
2. Mengapa warna yang dihasilkan masih coklat?

Jawaban :

1. Dilakukan proses deasetilasi secara bertahap. Misalnya untuk deasetilasi 3 jam dilakukan :1 jam, 1 jam, 1 jam.
2. Warna yang masih coklat karena tidak dilakukan dekalorisasi, untuk keperluan anti bakteri, proses dekalorisasi tidak penting.

LAMPIRAN

Tabel 1. Hasil karakterisasi kitosan

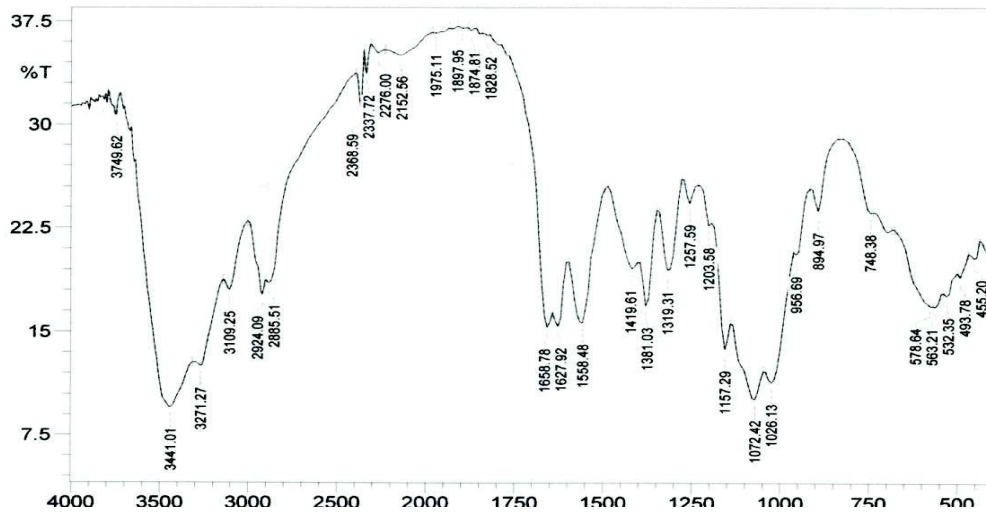
Karakterisasi Kitosan	Deskripsi
Kadar Air	(2,3±0,1)%
Kadar Abu	4,038 %
Berat Molekul	376,930 kDa
Derajat Polimerisasi	2.338
Viskositas	(1,33 ± 0,04) cp
Daya Ikat Air	(590±21,3)%
Daya Ikat Minyak	(569±4,29)%
Kelarutan	(28±3,2)%
Derajat Deasetilasi	82,72 %

Tabel 2. Hasil karakterisasi kitosan hidrolisat

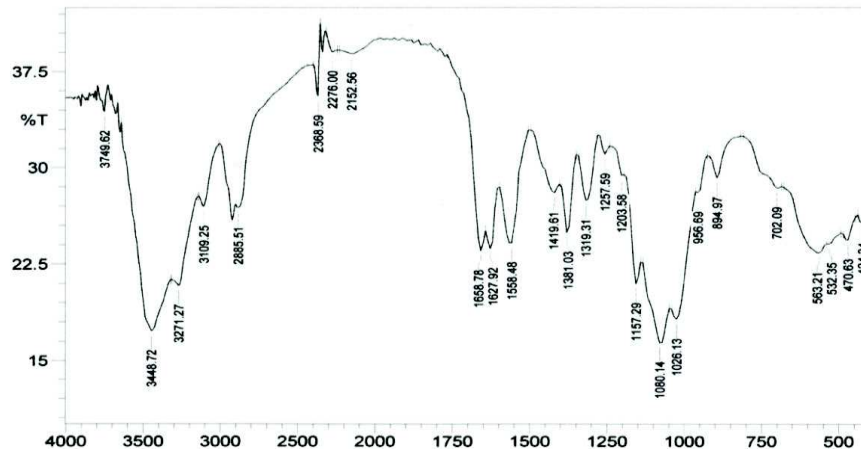
Parameter	Deskripsi
Rendemen	60 %
Berat Molekul	339,625 kDa
Derajat Polimerisasi	2.107
Derajat Deasetilasi	85%

Tabel 3. Uji aktivitas antibakteri kitosan hidrolisat pada *K. Pnemunia*

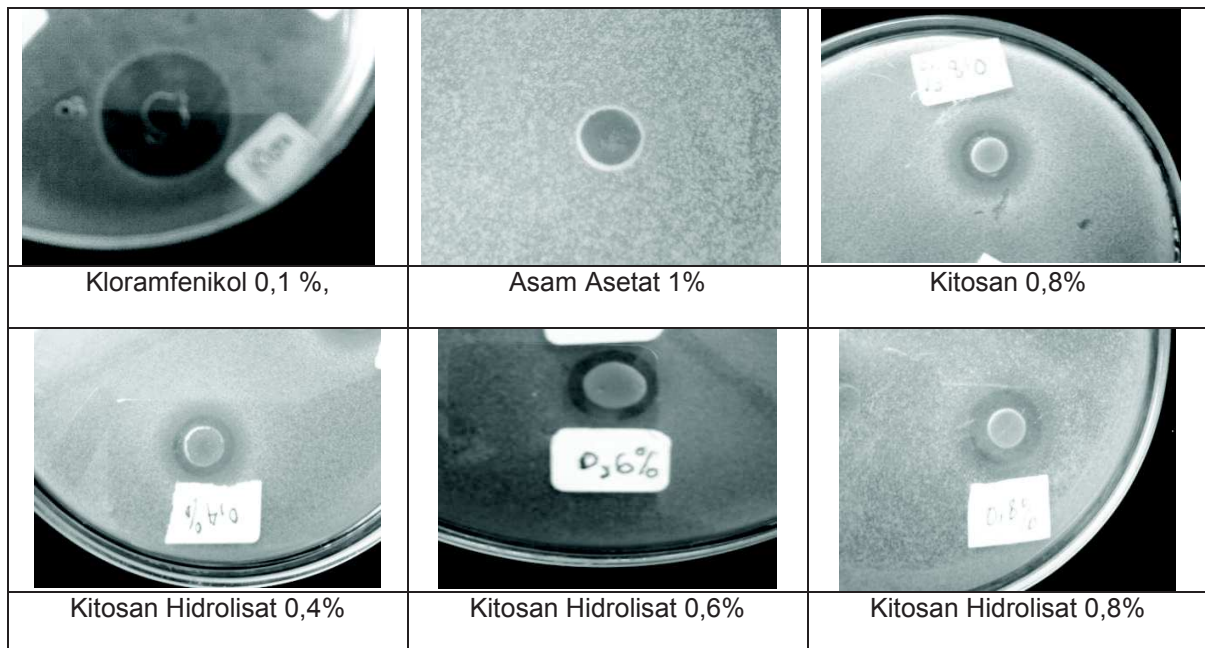
No	Sampel Uji	Zona Hambat (mm)
1.	Asam asetat 1% (kontrol negatif)	0
2.	Kloramfenikol 0,1 % (kontrol positif)	21,08
3.	Kitosan (0,8%)	8,04
4.	Kitosan Hidrolisat (0,4%)	8,71
5.	Kitosan Hidrolisat (0,6%)	10,38
6.	Kitosan Hidrolisat (0,8%)	15,91



Gambar 1. Spektra FTIR pada produk Kitosan



Gambar 2. Spektra Kitosan hidrolisat



Gambar 3. Uji aktivitas antibakteri kitosan hidrolisat terhadap *K. Pneumonia*