

## SINTESIS KHITOSAN TERMODIFIKASI ALDEHID - AMONIUM KUATERNER DAN UJI AKTIVITASNYA SEBAGAI ZAT ANTI BAKTERI *Escherichia coli*

Endang Susilowati<sup>1)</sup>, Maryani<sup>2)</sup>, M.Masykuri<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Program Studi Pendidikan Kimia PMIPA FKIP UNS, <sup>2)</sup> Jakultas Kedokteran UNS  
Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta, e-mail: endwati@yahoo.co.id

### Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk sintesis zat antibakteri khitosan dimodifikasi dengan gugus samping aldehyd dan ammonium kuarterner dan menguji aktivitasnya terhadap bakteri E.Coli isolat klinis dan standar. Sintesis dilakukan melalui tahap-tahap deasetilasi, substitusi aldehyd dan substitusi amonium kuarterner. Karakterisasi yang dilakukan terhadap produk khitosan meliputi derajat deasetilasi, berat molekul (Mw), sedangkan karakterisasi terhadap produk khitosan tersubstitusi amonium kuarterner mencakup derajat substitusi dan struktur kimia (FTIR dan NMR). Uji aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi terhadap bakteri gram positif S.Aureus dan bakteri gram negatif E.Coli. Bakteri yang digunakan adalah bakteri standar dan bakteri isolat klinis. Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan: 1)Telah berhasil diperoleh produk khitosan, khitosan termodifikasi aldehyd-ammonium kuarterner, dengan variasi aldehydnya adalah *formaldehyde*, *asetaldehyde*, *propionaldehyde* dan *benzaldehyde*, 2) Produk Khitosan yang dihasilkan memiliki sifat fisika yang cukup baik yaitu derajat deasetilasi sebesar 88,8% dan berat molekul rata-rata unit ulang (Mw) sebesar 165,85. 3) Dari aspek struktur kimia, produk khitosan, Khitosan termodifikasi aldehyd-ammonium kuarterner telah dapat dibuktikan dari analisis FTIR dan NMR-1H. 4) Produk khitosan dan khitosan termodifikasi memiliki aktivitas antibakteri yang cukup baik yaitu memiliki diameter hambatan antara 19 mm sampai 21 mm untuk bakteri gram negatif E.Coli baik bakteri standar maupun isolat klinis.

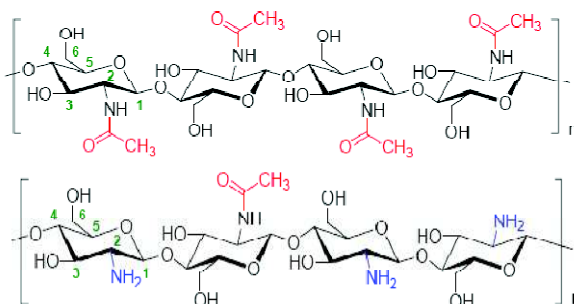
Kata kunci : khitosan, aldehyd, ammonium kuarterner, antibakteri, E.coli

### PENDAHULUAN

Potensi produksi udang di Indonesia dari tahun ke tahun terus meningkat. Selama ini potensi udang Indonesia rata-rata meningkat sebesar 7,4 persen per tahun. Data tahun 2001, potensi udang nasional mencapai 633.681 ton. Dengan asumsi laju peningkatan tersebut tetap, maka pada tahun 2004 potensi udang diperkirakan sebesar 785.025 ton. Limbah yang dihasilkan dari proses pembekuan udang, pengalengan udang, dan pengolahan kerupuk udang berkisar antara 30% - 75% dari berat udang (bagian kulit dan kepala) sehingga diperkirakan akan dihasilkan limbah udang sebesar 510.266 ton (Harian Kompas, 15 Juli 2004).

Pada sisi lain kebutuhan obat-obatan, khususnya zat antibakteri untuk keperluan medis semakin meningkat. Melalui teknologi yang tepat, potensi limbah udang ini dapat diolah lebih lanjut menjadi khitosan untuk zat antibakteri. Masalah utama yang selama ini terjadi adalah kelarutan khitosan yang hanya larut dalam asam dan pelarut organik sehingga hanya dapat digunakan pada kondisi yang terbatas. Pada aspek ini, penelitian yang diusulkan memiliki nilai strategis karena akan menghasilkan produk zat antibakteri khitosan dengan gugus samping aldehyd dan ammonium kuarterner yang memiliki aktivitas antibakteri yang tinggi sekaligus larut air sehingga memperluas pemakaian dalam bidang kedokteran dan farmasi.

Khitosan adalah nama lain dari  $\beta$ -(1,4)-2-amino-2-dioksi-D-glukosa, merupakan turunan dari khitin melalui proses deasetilasi. Khitosan merupakan senyawa yang tidak larut dalam air, larutan basa kuat, sedikit larut dalam HCl dan HNO<sub>3</sub>, dan tidak larut dalam H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Khitosan mudah mengalami biodegradasi, mudah berinteraksi dengan zat-zat organik dan bersifat polielektrolitik (Hirano, 1986; Muzzarelli, 1986), memiliki sifat antimikroba (antibakteri dan antifungi) yang cukup baik (Liu, et al, 2001; Gerasimenko, D.V., et al, 2004, Li, Z., et al, 2002)..



Gambar 1. Struktur kimia dari khitin (atas) dan khitosan (bawah)

Penelitian ini mengembangkan sintesis khitosan larut air melalui jalur substitusi amonium kuarterner menggunakan glycidyl trimethylammonium chloride yang berfungsi sebagai *quaternizing agent*.

## METODE PENELITIAN

### Alat dan Bahan

#### 1. Alat

Alat-alat yang dipakai dalam penelitian ini terdiri dari: spektrometer FTIR, NMR 1-H, aluminium foil, gas nitrogen, gelas beker, erlenmeyer, gelas arloji, labu ukur, buret, neraca analitik, termometer, dan cawan petri.

#### 2. Bahan

Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini terdiri dari: limbah udang windu (lokal), formaldehyde 35% (E-Merck), asetaldehyde (E-Merck), propionaldehyde (E-Merck), benzaldehyde(E-Merck), glycidyl trimethylammonium chloride (E-Merck), NaOH (Aldrich), HCl (Aldrich), aseton (Aldrich), sodium hypochloride (Sigma), CH<sub>3</sub>COOH(Sigma), NaBH<sub>3</sub>CN (Aldrich), methanol(Aldrich), silika gel, *dessicant* (Aldrich), akuades, Isolat coli ATCC 11229, standar E. coli ATCC 122.

### Prosedur Penelitian

#### a. Pembuatan Khitosan

Bahan baku berasal dari limbah udang windu dari pasar tradisional di Surakarta. Limbah udang dicuci dan dikeringkan. Selanjutnya di haluskan dan diayak dengan ukuran ayakan 80 - 100 mesh.. Ada 4 tahap proses perolehan khitosan yaitu deproteinasi, demineralisasi penghilangan warna (dekolorisasi) dan deasetilasi

#### b. Substitusi Aldehid

Khitosan (1g, 5,2 meq. NH<sub>2</sub>) dilarutkan dalam 1% (0,2 M) asam asetat (100 mL). Setelah itu ditambah 3 mL asam asetat glasial dan 0,132g (0,2 meq) *benzaldehyde* (untuk senyawa aldehid yang lain, *formaldehyde*, *asetaldehyde*, atau *propionaldehyde* berat ditimbang sesuai 0,2 meq). Reaksi dilakukan pada suhu kamar selama 6 – 10 jam sampai pembentukan basa Schiff selesai. Kemudian ditambah NaBH<sub>3</sub>CN (0,2 meq.) sambil diaduk pada suhu kamar dan pH 7. Endapan dicuci beberapa kali menggunakan air dilanjutkan dengan aseton sehingga menghasilkan endapan berbentuk serbuk, yang kemudian dikeringkan dibawah kondisi nitrogen selama 12 jam.

#### c. Substitusi Ammonium Kuaterner

Sebanyak 0,5 g khitosan disuspensikan dan distirrer selama 20 menit dalam 35 mL larutan glycidyl trimethylammonium chloride 65% sehingga campuran akan menjadi seperti bubur. Pada suhu kamar, larutan NaOH (8,5 g dilarutkan

dalam 10 mL air) dimasukkan ke dalam campuran dan melanjutkan pengadukan dengan stirrer sampai 18 jam (campuran akan menjadi agak panas pada awal reaksi). Selanjutnya air (100 mL) ditambahkan ke dalam campuran dan campuran dipanaskan pada 60°C, sedangkan stirring dilanjutkan selama 4-8 jam. Setelah didinginkan sampai suhu kamar, ditambah larutan HCl sampai pH-nya 7. Selanjutnya produk akhir ini di-dialisis dengan air (≈ 4L) selama 2 hari.

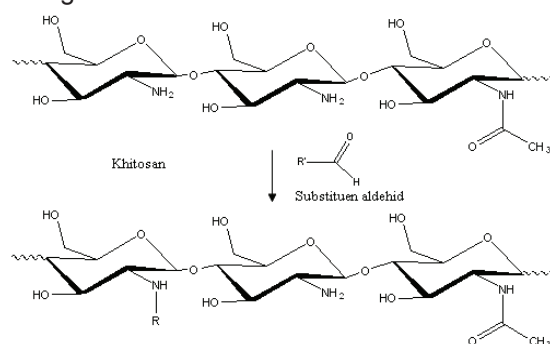
#### d. Karakterisasi dan Uji aktivitas antibakteri

Karakterisasi produk khitosan meliputi kandungan abu, derajat deasetilasi, berat molekul, viskositas, kelarutan, kapasitas ikat air dan kapasitas ikat lemak. Disamping itu juga dilakukan karakterisasi struktur menggunakan FTIR dan <sup>1</sup>H NMR untuk khitosan dan khitosan termodifikasi. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi menggunakan bakteri E.Coli standar dan klinis

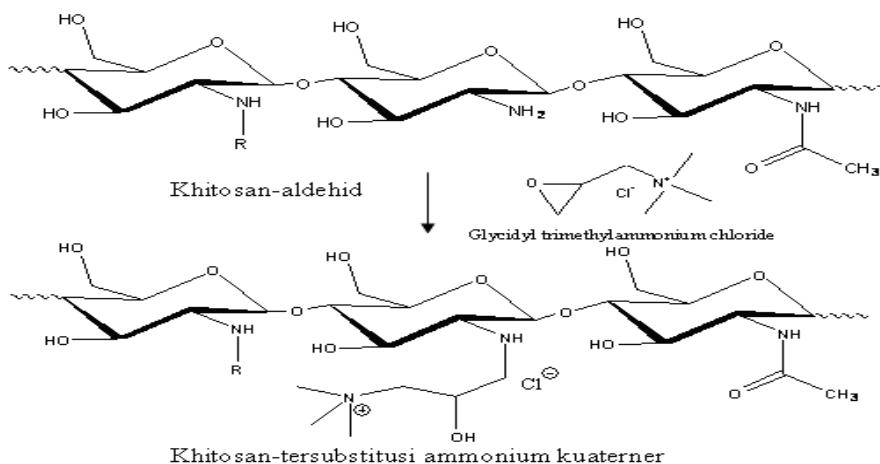
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### A. Modifikasi Khitosan

Implementasi penelitian di laboratorium meliputi pengembangan teknik sintesis zat antibakteri khitosan dengan variasi gugus samping aldehid dan amonium kuaterner. Tahapan sintesis yang telah dilakukan melalui tahap-tahap deasetilasi, substitusi aldehid dan substitusi amonium kuaterner. Pada tahap substitusi aldehid, dipilih 4 jenis aldehid yaitu *benzaldehyde*, *formaldehyde*, *asetaldehyde*, dan *propionaldehyde*. Produk berupa padatan agak kasar berwarna putih. Reaksi berlangsung dalam mekanisme pembentukan basa Schiff. Reaksinya dapat digambarkan sebagai berikut

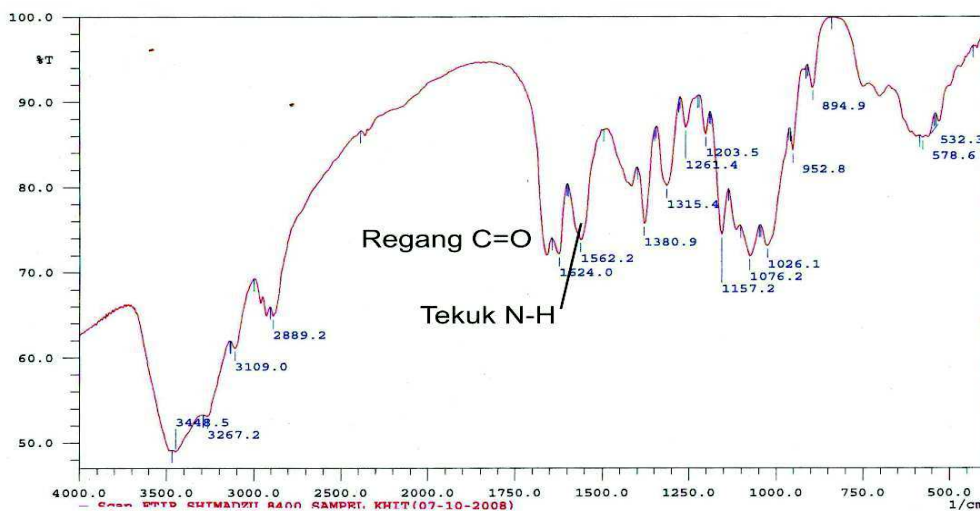


Tahap terakhir dalam sintesis khitosan antibakteri larut air dalam penelitian ini, dilakukan substitusi ammonium kuaterner menggunakan. pada tahap ini diper oleh produk berupa larutan keruh. Reaksi yang terjadi digambarkan sebagai berikut:



Tabel 1. Karakter Fisik Produk Khitosan

Parameter	Kuantitas
Kandungan air	6,068 ± 0,490 %
Kandungan abu	0,582 ± 0,081 %
Derajat deasetilasi	88,8%
Berat molekul unit ulang (Mw unit ulang)	165,85
Viskositas	0,904 ± 0,011 cP
Kelarutan	77,550 ± 0,465 %
Kapasitas ikat air (WBC)	990,450 ± 71,004 %
Kapasitas ikat lemak (FBC)	424,260 ± 41,609 %



Gambar 2. Spektra FTIR produk khitosan

Tabel 2. Identifikasi Puncak Serapan FTIR

Bilangan gelombang (cm <sup>-1</sup> )	Keterangan
3448,5 (s, br)	regang O-H (H terikat)
2889,2 (s, sh)	regang simetrik C-H dari CH <sub>2</sub>
1624,0 (s, sh)	regang C=O (H tak terikat)
1562,2 (s, sh)	regang N-H
1423,4 (s, sh)	regang C-C cincin aromatik
1380,9 (s, sh)	regang C-O dan tekuk O-H
1261,4 (s, sh)	regang C-O dan tekuk O-H
1103,9 (s, sh)	regang asimetrik C-O-C ether alifatik
1032,9 (s, sh)	regang asimetrik C-O-C

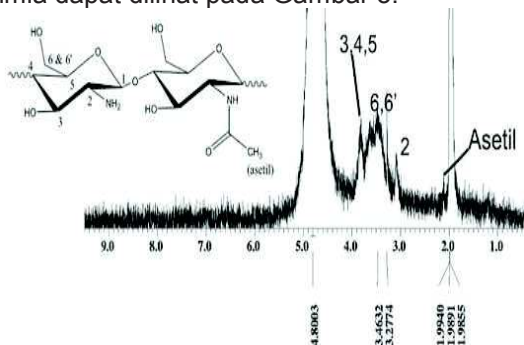
## B. Karakter Fisik Produk Khitosan

Pengujian karakter fisik yang dilakukan terhadap produk khitosan meliputi kandungan air, abu, derajat deasetilasi, berat molekul unit ulang, viskositas, kelarutan, densitas ruah, kapasitas ikat air (WBC) dan kapasitas ikat lemak (FBC). Hasil pengujian disarikan dalam tabel 1.

## C. Struktur Kimia Produk Khitosan dan Khitosan Tersubstitusi

Untuk memastikan terbentuknya khitosan dan khitosan tersubstitusi, dilakukan identifikasi menggunakan FTIR dan NMR-<sup>1</sup>H. Spektra FTIR produk khitosan diberikan dalam Gambar 2 sedangkan identifikasi puncak serapan disarikan dalam Tabel 2.

Hasil dari FTIR diperkuat oleh hasil pembacaan spektra NMR-<sup>1</sup>H menggunakan spektra Delta 2 NMR 500 MHz dari khitosan beserta interpretasi terhadap pergeseran kimia dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Spektrum NMR-<sup>1</sup>H produk khitosan (pelarut asam asetat-d<sub>4</sub> 1% dalam D<sub>2</sub>O)

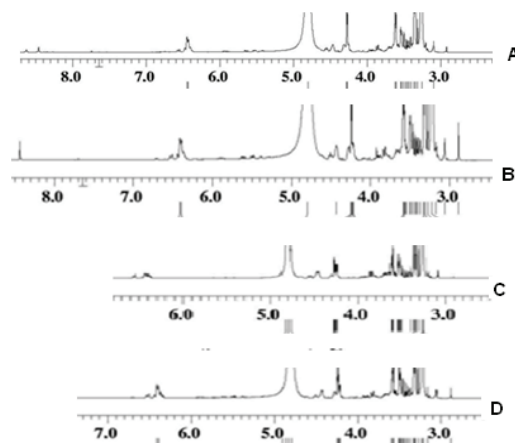
Dalam struktur khitosan di atas, proton C-2, 3, 4, 5, 6 dan 6' muncul pada pergeseran kimia  $\delta = 3,1 - 3,9$ . Proton C-1 tidak muncul puncaknya karena puncak pergeseran kimia ( $\delta$ ) yang dimiliki sangat dekat dengan puncak air ( $\delta = 4,6 - 4,9$ ). Untuk spektra NMR-<sup>1</sup>H pada khitosan termodifikasi aldehyd dan ammonium kuterneer dapat dilihat pada Gambar 4. Munculnya puncak pada pergeseran kimia  $\delta = 3,5$  menunjukkan gugus samping ammonium kuterneer sudah terbentuk.

## D. Aktivitas Antibakteri Khitosan Tersubstitusi Aldehyd Dan Amonium Kuterneer

### 1. Sensitifitas bakteri uji terhadap berbagai antimikroba

Pemeriksaan sensitifitas bakteri uji terhadap mikroba perlu dilakukan untuk mengetahui terjadinya resistensi bakteri terhadap antibakteri tertentu. Pada penelitian ini dilakukan uji sensitifitas untuk 10

antibiotika yang digunakan dipasaran. Hasil uji sensitifitas dapat dilihat pada Tabel 3.



Gambar 4. Spektra NMR-<sup>1</sup>H khitosan termodifikasi.

A:Khit-asetaldehyd-ammonium kuterneer,  
B:Khit-benzaldehyd-ammonium kuterneer,  
C:Khit-formaldehyd-ammonium kuterneer,  
D: Khit-propionaldehyd-ammonium kuterneer.

Isolat Escherechia coli ATCC 11229 merupakan isolat E. coli standar yang didapat dari kultur murni kuman standar E. coli ATCC 122, isolat Escherechia coli 122 merupakan isolat E. coli klinis yang didapat dari kultur sampel jaringan yang berasal RS Orthopaedi Surakarta. Isolat S. aureus ATCC 6538 merupakan isolat E. coli standar yang didapat dari kultur murni kuman standar S. aureus ATCC 6538, isolat S.aureus 79 merupakan isolat S. aureus klinis yang didapat dari kultur sampel pus yang berasal RS Orthopaedi Surakarta.

Dari Tabel 5 diketahui bahwa isolat standar masih sensitiv terhadap hampir seluruh antimikroba yang diujikan, sedangkan isolat klinis telah resisten terhadap hampir seluruh antimikroba yang diujikan. Staphylococcus aureus 79 hanya sensitiv terhadap antimikroba chloramphenicol, sedangkan Escherechia coli 122 hanya sensitiv terhadap imipenem dan tibramycin, sehingga untuk langkah selanjutnya digunakan chloramphenicol sebagai kontrol positif untuk Staphylococcus aureus dan tobramycin sebagai kontrol positif untuk E. coli.

### 2. Aktivitas antibakteri Escherechia coli

Diameter hambatan khitosan dan khitosan gugus samping terhadap pertumbuhan Escherechia coli standar dapat dilihat pada Tabel 4. Dari Tabel 4 ditemukan diameter hambatan khitosan terhadap pertumbuhan Escherechia coli isolat standar relatif lebih kecil dibanding terhadap pertum-

Tabel 3. Hasil pemeriksaan sensitifitas bakteri uji terhadap berbagai antimikroba

NO	ANTIMIKROBA	E. coli (ATCC 11229)	E. coli (ATCC 122)
1.	Amikacin	sensitiv	resisten
2.	Amoxycillin	sensitiv	resisten
3.	Aztreonam	sensitiv	resisten
4.	Azithromycin	-	intermediate
5.	Chloramphenicol	sensitiv	resisten
6.	Ciprofloxacin	-	resisten
7.	Gentamicin	sensitiv	resisten
8.	Ceftriaxon	sensitiv	resisten
9.	Clarithromycin	-	-
10.	Doxyciclin	sensitiv	intermediate

Tabel 4. Diameter hambatan khitosan dengan berbagai modifikasi gugus samping terhadap pertumbuhan *Escherechia coli*..

NO	Sampel	<i>Escherechia coli</i> standar (ATCC 11229) (mm)	<i>Escherechia coli</i> klinis (79) (mm)
1.	Khitosan	11	10
2.	Khitosan Formaldehid Ammonium kuarterner	21	22
3.	Khitosan Asetaldehid Ammonium kuarterner	20	21
4.	Khitosan Benzaldehid Ammonium kuarterner	15	21
5.	Khitosan Propionaldehid Ammonium kuarterner	21	19
6.	Aquabides (kontrol negatif)	0	0
7.	Tobramycin (kontrol positif)	20	18

buhan *Escherechia coli* isolat klinis. Hal ini menunjukkan bahwa tidak nampak besar pengaruh resistensi terhadap antimikroba pada daya hambat khitosan terhadap *Escherechia coli*. Hal ini memberikan harapan akan tersedianya antimikroba alternatif disamping antimikroba yang telah ada. Sementara itu, dibanding dengan khitosan murni, khitosan dengan modifikasi gugus samping menghasilkan peningkatan diameter hambatan pertumbuhan kuman.

#### SIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan:

1. Telah berhasil diperoleh produk khitosan, khitosan termodifikasi aldehid dengan variasi panjang rantai *formaldehid*, *asetaldehid*, *propionaldehid* dan *benzaldehyd*, dan zat antibakteri khitosan termodifikasi aldehid dan ammonium kuarterner
2. Produk Khitosan yang dihasilkan memiliki sifat fisika yang cukup baik yaitu derajat deasetilasi sebesar 88,8% dan berat

molekul rata-rata unit ulang (Mw) sebesar 165,85.

3. Dari aspek struktur kimia, produk khitosan, Khitosan termodifikasi aldehid dan Khitosan tersubstitusi ammonium kuarterner telah dapat dibuktikan dari analisis FTIR dan NMR-1H
4. Produk khitosan termodifikasi memiliki aktivitas antibakteri yang cukup baik yaitu memiliki diameter hambat antara antara 19 mm sampai 22 mm pada bakteri gram negatif *E.Coli* baik bakteri standar maupun isolat klinis.

Produk khitosan ini berpeluang bisa menjadi antibiotik alternatif. Penelitian yang diperlukan selanjutnya adalah uji aktivitas antibakteri secara invitro terhadap hewan percobaan dan uji klinis terhadap manusia

#### DAFTAR PUSTAKA

- Anthonsen, M.W. dan Smidsrod, O. 1995. *Carbohydr. Polym.* 26, 303.
- Baumann, H.dan Faust, V. 2001. *Carbohydr. Res.*,331, 43.
- Domard, A.; Rinaudo, M.; Terrassin, C. 1986. *Int. J. Biol. Macromol.* 8, 105.

- Focher, B., Naggi, A., Tarri, G., Cosami, A. and Terbojevich, M. 1992. Structural Differences Between Chitin Polymorphs and Their Precipitates from Solution Evidence from CP-MAS 13 C-NMR, FT-IR and FT-Raman Spectroscopy. *Charbohidrat Polymer*. 17 (2) : 97 – 102.
- Gerasimenko, D.V.; Avdienko, I.D.; Bannikova, G.E.; Zueva, O.Y.; Varlamov, V.P. 2004. *Appl. Biochem. Microbiol.* 40(3), 301.
- Harian Kompas, Kamis, 15 Juli 2004. *Pemanfaatan Limbah Cangkang Udang - Sebagai Bahan Pengawet Kayu Ramah Lingkungan.*
- Hirano, S. 1986. *Chitin and Chitosan*. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Republicka of Germany. 5th . ed. A 6: 231 – 232.
- Kim, C.H. dan Choi, K.S. 1998. *J. Ind. Eng. Chem.* 4(1), 19.
- Li, Z.; Liu, X.; Zhuang, X.; Guan, Y.; Yao, K. 2002. *J. Appl. Polym. Sci.* 84, 2049.
- Lim, S.-H.; Hudson, S.M. 2003. *J. Macromol. Sci. Part C- Polymer Reviews* C43(2), 223.
- Liu, X.F.; Guan, Y.L.; Yang, D.Z.; Li, Z.; Yao, K.D. 2001 *J. Appl. Polym. Sci.* 79, 1324.
- Muzzarelli, R.A.A. 1986. *Chitin*. Faculty of Medicine University of Ancona. Italy. Pergamon Press. 81 –87.
- Muzzarelli, R.A.A.; Jeuniaux, C.; Gooday, G.W. 1986. *Chitin in Nature and Technology*, New York: Plenum.
- Roberts, G.A.F. 1992. *Chitin Chemistry*; London: MacMillan Press Ltd.
- The Merck Index an Encyclopedia of Chemicals and Drugs. 1976. *Chitin*. 9th . Ed. Merck and Co. Int.Rahway. N.J. USA. pp. 259.
- Tokura, S. and N. Nishi. 1995. *Specification and Characterization of Chitin and Chitosan*. Collection of Working Papers. 28. Universiti Kebangsaan Malaysia 8 : 67 – 78