

PENGARUH METODE ISOLASI TERHADAP SIFAT KARAKTERISASI KITOSAN

Agung Nugroho Catur Saputro¹, Indriana Kartini², & Sutarno³

¹ Program Studi Pendidikan Kimia Jurusan PMIPA FKIP UNS Surakarta

^{2,3} Lab. Kimia Anorganik Jurusan Kimia FMIPA UGM Yogyakarta

Email : anc_saputro@yahoo.co.id

ABSTRACT

Three type of chitosans are DPMA, DMA and DPA were isolated from crab shell waste. The purpose of this study are : 1). To produce chitosan from crab shell waste with good quality, 2). To study the effect of reduction deproteinatation step in sintesis chitosan process through characteristic chitosan properties, 3). To study the effect of reduction demineralization step in sintesis chitosan process through characteristic of chitosan properties. Deproteinatation step was done with NaOH 4% solution, demineralization step was done with HCl 1 M solution, and deasetilation step was done with NaOH 50% solution. The characterization of chitosan consist of deasetilation degree value (DD) with base line method, viscosity, water composition, ashes composition, and Ca mineral composition. The result of study shown that IR spectra of chitosan DMA similarity with spectra of chitosan DPMA, and spectra of chitosan DPA is different with them. The deasetilation degree value of chitosan DPMA = DPMA = 86,59%, DMA = 92,09%, DPA = 81,26%, viscosity of chitosan DPMA = 96,33 cps, DMA = 89,67 cps, DPA = 89,67 cps, water content of chitosan DPMA = 7,425%, DMA = 11,67%, DPA = 3,375%, ashes content of chitosan DPMA = nihil, DMA = 1,60%, DPA = 46,85%, and Ca mineral content of chitosan DPMA = 0,1215%, DMA = 1,0715%, dan DPA = 14,6235%.

Key word : *chitosan preparation, method variation, characterization, DPMA, DMA, DPA.*

PENDAHULUAN

Kitosan adalah senyawa produk deasetilasi dari kitin yang merupakan biopolymer alami kedua terbanyak di alam setelah selulosa. Setiap tahun sekitar 100 milyar ton kitin diproduksi di permukaan bumi ini oleh krustasea, kerang, rajungan, serangga, jamur dan organisme lainnya. Sebagai Negara maritim, Indonesia sangat berpotensi menghasilkan kitin dan produk turunannya. Kitosan yang ada di pasar Indonesia saat ini berasal dari Korea Selatan, India, Jepang, USA, dan

Negara maju lainnya dengan harga kitosan minimum per kg US\$ 20-25, sedangkan untuk harga kitin minimum per kg antara US\$ 6.50-9 (<http://lc.bppt.go.id/ipitek>)

Kitosan dapat dikarakterisasi dengan sifat intrinsik (kemurnian, berat molekul, viskositas, dan derajat deasetilasi) dan bentuk fisik. Lebih lanjut, kualitas dan sifat kitosan mungkin bervariasi karena banyak faktor dalam proses preparasi yang dapat mempengaruhi karakteristik produk kitosan akhir. Kitosan secara komersial dijual dengan variasi grade kemurnian, berat molekul dan derajat deasetilasi. Dilaporkan bahwa derajat deasetilasi merupakan salah satu faktor penting dalam karakterisasi kitosan, yang mempengaruhi kinerja kitosan dalam berbagai aplikasi (Khan, 2002). Derajat deasetilasi merupakan salah satu karakteristik penting yang dapat mempengaruhi kinerja (*performance*) kitosan dalam banyak aplikasi (Khan, 2002). Derajat deasetilasi yang menggambarkan kandungan gugus amina bebas dalam polisakarida dapat digunakan untuk membedakan antara kitin dengan kitosan. Jika polisakarida mempunyai derajat deasetilasi kurang dari 75% maka dikategorikan sebagai kitin sedangkan jika lebih besar dari 75% maka dikategorikan sebagai kitosan (Khan, 2002). Kwon T. Hwang *et al.* (2002) dengan menggunakan Response Surface Methodology (RSM) untuk mengontrol MW dan DD kitosan pada proses kimia. Dia menemukan bahwa MW kitosan bergantung kepada crossproduct Temperatur dan konsentrasi NaOH dan crossproduct konsentrasi NaOH dan waktu. DD berbanding lurus dengan temperature dan konsentrasi NaOH. Kitosan terdepolimerisasi secara lebar pada range MW 1.100 kDa – 100 kDa dan DD sebesar 67.3 – 95.7 dengan perlakuan NaOH alkali naik secara drastis. MW turun dan DD naik secara drastis seiring dengan kenaikan temperature, waktu reaksi dan konsentrasi NaOH. Laju penurunan MW dan kenaikan DD secara global turun dengan penambahan waktu Retention (Kwon T, 2002).

Proses sintesis kitosan melibatkan tahap deproteinasi (penghilangan protein) dengan basa kuat konsentrasi rendah, demineralisasi (penghilangan mineral) dengan asam kuat konsentrasi rendah, dan deasetilasi (pemutusan gugus asetil) dengan basa kuat konsentrasi tinggi. Proses deproteinasi dan deasetilasi menggunakan basa

kuat yang sama hanya berbeda konsentrasi, berarti kedua proses ini merupakan pemborosan bahan kimia basa kuat. Maka perlu diteliti apakah penghilangan tahap deproteinasi dalam proses sintesis kitosan mampu menghasilkan kitosan yang mutunya tetap baik agar dapat dilakukan penghematan penggunaan basa kuat. Di samping itu karena mutu dan sifat kitosan juga dipengaruhi oleh sumber bahan baku dan metode preparasinya, maka juga perlu diteliti apakah penghilangan tahap demineralisasi dalam proses sintesis kitosan juga akan menghasilkan kitosan dengan mutu yang baik juga.

Oleh karena itu, maka tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Menghasilkan kitosan dari limbah cangkang kepiting dengan mutu yang baik
2. Mengkaji efek penghilangan tahap deproteinasi dalam proses sintesis kitosan terhadap sifat karakterisasi kitosan
3. Mengkaji efek penghilangan tahap demineralisasi dalam proses sintesis kitosan terhadap sifat karakterisasi kitosan

BAHAN DAN METODE EKSPERIMEN

Bahan : Kitosan diisolasi dari limbah cangkang kepiting dari daerah tarakan, Kalimantan. Bahan kimia yang dipakai untuk sintesis kitosan adalah NaOH (Merk), HCl (Merk), aquades (Lab Kimia Analitik FMIPA UGM).

Metode :

Isolasi kitosan dari limbah cangkang kepiting dari daerah tarakan secara umum dilakukan melalui 4 tahap perlakuan, yaitu persiapan, deproteinasi, demineralisasi, dan deasetilasi.

Tahap persiapan dilakukan dengan mencuci dan membersihkan limbah cangkang kepiting yang diperoleh dari restoran *seafood* dari sisa-sisa daging yang masih menempel pada cangkang, bahkan kalau perlu dengan menggunakan sikat. Setelah sisa-sisa dagingnya bersih, cangkang kemudian dibilas dengan air bersih kemudian dijemur di bawah terik sinar matahari sampai kering. Setelah cangkang kepiting kering, kemudian dilakukan penggerusan dengan menggunakan blender dan

disaring sampai diperoleh serbuk cangkang kepiting yang lolos ayakan 100 mesh (150 μm).

Tahap deproteinasi, menggunakan larutan NaOH konsentrasi rendah. Pada penelitian ini digunakan larutan NaOH 4% dengan perbandingan berat serbuk cangkang dengan volume larutan NaOH adalah 1 : 10 (b/v). Proses penghilangan protein ini disebut tahap deproteinasi. Tahap deproteinasi dilakukan dengan menggunakan seperangkat alat refluks dan dilakukan pada suhu 80°C selama 1 jam.

Tahap demineralisasi menggunakan larutan asam klorida, HCl 1 M dengan perbandingan berat sampel dengan volume larutan HCl adalah 1 : 15 (b/v) selama 3 jam pengadukan pada suhu kamar. Serbuk cangkang kepiting yang telah melalui tahap perlakuan deproteinasi dan demineralisasi selanjutnya dikenal dengan sebutan kitin.

Kitin yang telah diperoleh kemudian dilakukan tahap deasetilasi dengan menggunakan larutan NaOH 50% b/v dengan perbandingan kitosan : larutan NaOH 50% adalah 1 : 15. Tahap deasetilasi dilakukan pada suhu 100°C selama 2 jam pengadukan dengan menggunakan magnetic stirer. Tahap deasetilasi ini juga dilakukan dengan menggunakan alat refluks.

Pada penelitian ini, kitosan yang diperoleh dibedakan menjadi tiga tipe berdasarkan tahap-tahap isolasinya, yaitu kitosan tipe DPMA, DMA, dan DPA. Kitosan yang diperoleh dengan perlakuan tahap deproteinasi, demineralisasi dan deasetilasi selanjutnya dinamakan kitosan tipe DPMA, sedangkan yang hanya melalui tahap demineralisasi dan deasetilasi dinamakan kitosan tipe DMA, dan kitosan yang hanya melalui tahap deproteinasi dan deasetilasi dinamakan kitosan tipe DPA.

Kitosan yang diperoleh dengan tahap-tahap perlakuan yang berbeda tersebut selanjutnya dilakukan uji karakterisasi untuk membandingkan perbedaan sifat fisik dan kimia masing-masing ketiga tipe kitosan yang nantinya akan menentukan mutu dari kitosan tersebut.

Uji Karakterisasi. Spektra IR kitosan diperoleh dengan menggunakan Spektrofotometer infra merah Shimadzu FTIR-8201 PC. Pengukuran

viskositas kitosan menggunakan viskometer Brookfield (Model LV-2, ISO 9002 Certified). Spindel yang digunakan adalah spindel 2 dengan kecepatan 30 rpm. Nilai kekentalan kitosan dihitung dengan persamaan berikut :

Viskositas (cPs atau mPas) = nilai terukur x faktor konversi

Faktor konversi untuk spindle 2 dan kecepatan 30 rpm adalah 10.

Larutan kitosan untuk pengukuran viskositas dibuat dengan cara melarutkan serbuk kitosan dalam larutan CH_3COOH 0,1 M dan larutan NaCl 0,2 M. Uji kadar air dan kadar abu secara gravimetric. Uji kadar Ca dengan menggunakan instrument AAS.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Mutu kitosan dapat ditentukan oleh jenis dan mutu bahan baku, kondisi proses, dan perlakuan selama penyimpanan. Lab. Protan (1987) dalam Dewi,A.S dan Fawzya, Y.N (2006) menetapkan standar mutu kitosan seperti pada Tabel 1. Dalam penelitian ini standar mutu kitosan dari Lab. Protan dipergunakan sebagai referensi penentuan mutu kitosan hasil sintesis.

Tabel 1. Standar Mutu Kitosan

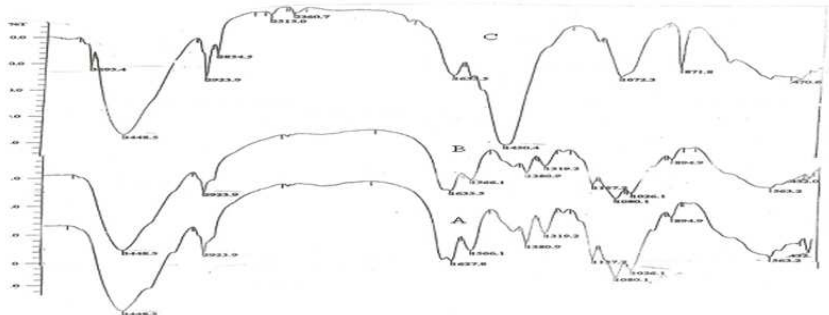
Parameter	Nilai
1. Ukuran partikel	Serpihan atau serbuk
2. Kadar air	$\leq 10\%$
3. Kadar abu	$\leq 2\%$
4. Warna larutan	Jernih
5. Derajat deasetilasi	$\geq 70\%$
6. Viskositas	
• Rendah	< 200
• Sedang	200 – 799
• Tinggi	800 – 2000
• Sangat tinggi	> 2000

Sumber : Lab Protan (1987)

Kitosan DPMA, DMA, dan DPA yang diperoleh dari sintesis dilakukan uji karakterisasi untuk mengetahui sifat-sifat dan mutunya. Uji karakterisasi kitosan hasil sintesis ini meliputi : analisis spektra IR, penentuan harga derajat deasetilasi (DD) dengan metode base line, viskositas, kadar air, kadar abu, kadar Ca.

a. Perbandingan Spektra IR kitosan

Berdasarkan Gambar 1 di atas, tampak bahwa spektra IR antara kitosan DPMA yang diproses dengan tahap-tahap lengkap (deproteinasi, demineralisasi, dan deasetilasi) mempunyai bentuk spektra yang mirip dengan spektra IR kitosan DMA, sedangkan kitosan DPA mempunyai bentuk spektra yang berbeda.



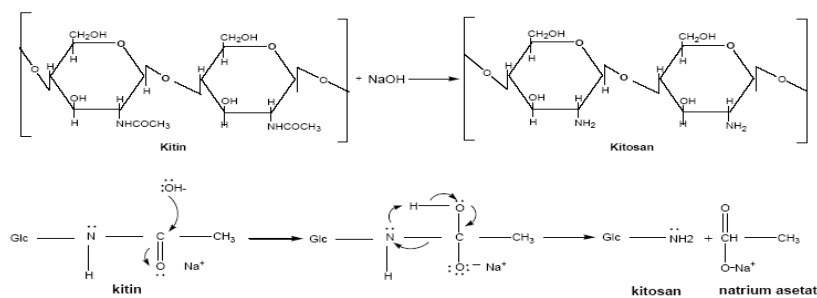
Gambar 1. Spektra IR Kitosan DPMA (A), DMA (B), dan DPA (C)

Kemiripan bentuk spektra IR antara kitosan DPMA dengan DMA menunjukkan kalau kedua tipe kitosan tersebut mempunyai struktur yang sama sama karena gugus-gugus fungsinya sama sehingga dapat diperkirakan sifat kitosan DMA mirip dengan sifat kitosan DPMA. Hal ini berarti penghilangan tahap deproteinasi tidak merubah struktur kimia dari kitosan yang dihasilkan sehingga dapat menjadi alternative dalam proses sintesis kitosan tanpa melalui tahap deproteinasi sehingga dapat menghemat pemakaian NaOH. Dalam rangka penghematan penggunaan NaOH dalam proses sintesis kitosan, penelitian Dewi,A.S dan Fawzya, Y.N (2006) menyimpulkan bahwa penggunaan larutan NaOH berulang relatif tidak berpengaruh terhadap sifat-sifat kitosan. Atas dasar dua hasil penelitian ini, maka dapat disimpulkan bahwa untuk penghematan penggunaan NaOH dalam proses sintesis kitosan dapat menggunakan dua cara alternative, yaitu tanpa melalui tahap deproteinasi atau penggunaan NaOH secara berulang.

Sedangkan spektra IR kitosan DPA berbeda dengan spektra IR kitosan DPMA menunjukkan bahwa kitosan DPA mempunyai struktur kimia yang berbeda sehingga diperkirakan juga akan mempunyai sifat yang berbeda dengan sifat kitosan DPMA.

b. Penentuan Derajat deasetilasi (DD)

Derajat deasetilasi menyatakan persentase gugus asetil yang telah dihilangkan dari kitin. Derajat deasetilasi yang tinggi menunjukkan bahwa kitosan yang dihasilkan murni. Konsentrasi basa kuat yang tinggi dalam proses deasetilasi dapat meningkatkan derajat deasetilasi dan memecah rantai molekul kitosan. Akibatnya, berat molekul dan viskositas kitosan menurun sedangkan kelarutannya meningkat. Proses deasetilasi ini dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Reaksi deasetilasi kitin

Menurut Khan et al. (2002), nilai derajat deasetilasi (DD) kitosan bergantung pada metode analisis yang digunakan. Derajat deasetilasi kitosan dapat ditentukan dengan beberapa metode, yaitu spektra IR (Yanming, D. et al. 2001., Velde, K.V dan Kiekens, P. 2004), spektra NMR (Lavertu, M. et al. 2003., Velde, K.V dan Kiekens, P. 2004), pirolisis-kromatografi gas (Sato, H. et al. 1998), titrasi pH-potensiometri (Balazs, N & Sipos, P. 2006), spektrofotometri UV (Tan, S.C. et al. 1998), dan difraktogram XRD (Zhang, Y. et al. 2005).

Pada penelitian ini derajat deasetilasi (DD) kitosan ditentukan berdasarkan spektra IR dengan metode *base line*. Metode penentuan derajat deasetilasi (DD) dengan menggunakan spektroskopi IR mempunyai kelebihan, yaitu pengukuran relatif cepat dan tidak memerlukan pelarutan sample kitosan dalam pelarut cair (Baxter et al. 1992; Sabnis & Block 1997 dalam Khan et al. 2002). Dalam penentuan derajat deasetilasi (DD) dengan berdasarkan spektra IR, digunakan dua base line sebagaimana diusulkan oleh Baxter dkk (Khan, 2002), walaupun pemilihan base line masih diperdebatkan, khususnya ketika

range sample tidak diketahui (*unknown*) (Tan,S.C. 1998). Berdasarkan perhitungan diperoleh harga DD seperti pada Tabel 2.

Berdasarkan nilai DD berbagai tipe kitosan di atas, maka tampak bahwa kitosan DMA memiliki nilai derajat deasetilasi paling besar yaitu 92,0971%. Kitosan tipe DPMA memiliki nilai DD sekitar 5,5 poin di bawah DMA yaitu sebesar 86,5929%, sedangkan nilai DD paling kecil dimiliki oleh kitosan tipe DPA sebesar 81,2658%. Jika dibandingkan dengan standar mutu kitosan yang ditetapkan oleh Lab. Protan (1987), maka ketiga tipe kitosan yang dihasilkan dalam penelitian ini termasuk kategori besar, karena rata-rata di atas 70% sebagaimana ditetapkan oleh Lab. Protan. Kitosan dengan derajat deasetilasi besar menunjukkan semakin banyaknya gugus asetil kitin yang diubah menjadi gugus amino.

Tabel 2 Harga Derajat Deasetilasi Kitosan berdasarkan metode base line (b)

No	Tipe Kitosan	Nilai DD (%)
1	DPMA	86,5929
2	DMA	92,0971
3	DPA	81,2658

Menurut Maghami & Robert (1988) serta Gummow & Robert (1985) dalam Ariyanti S.D. & Yusro N.F. (2006), derajat deasetilasi kitosan berpengaruh terhadap sifat fisik dan kimia serta aktivitas biologis kitosan. Sifat kitosan sangat dipengaruhi oleh derajat deasetilasi (DD), yang merupakan salah satu parameter penting dalam struktur kitosan (Dong Yanming. *et al.*, 2001).

Efek Penghilangan Tahap Deproteinasi terhadap Derajat Deasetilasi Kitosan. Berdasarkan perbandingan nilai derajat deasetilasi (DD) kitosan tipe DPMA dengan kitosan tipe DMA sebagaimana tampak pada Tabel 2, maka terlihat jelas bahwa kitosan tipe DMA memiliki harga DD yang lebih besar daripada kitosan tipe DPMA, yaitu DD kitosan DMA = 92,0971% dan DD kitosan DPMA = 86,5929%. Hal ini sesuai dengan analisis spektra IR antara kitosan tipe DPMA dengan DMA, yang menghasilkan kesimpulan bahwa spektra IR kitosan tipe DPMA mirip dengan DMA hanya perbedaannya berada pada besarnya intensitas puncak-puncak serapan. Intensitas puncak-puncak serapan pada

spektra IR kitosan tipe DMA lebih besar daripada DPMA, maka diperkirakan kitosan tipe DMA akan memiliki harga derajat deasetilasi yang lebih besar daripada kitosan tipe DPMA. Perkiraan ini ternyata benar bahwa kitosan tipe DMA memiliki harga DD yang lebih besar daripada DPMA. Dengan kata lain, penghilangan tahap deproteinasi pada proses isolasi kitosan dari limbah cangkang kepiting dapat menghasilkan kitosan yang memiliki harga DD lebih besar daripada kitosan yang diperoleh melalui proses isolasi meliputi tahap deproteinasi, demineralisasi, dan deasetilasi.

Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa penghilangan tahap deproteinasi pada proses isolasi kitosan dari cangkang kepiting tidak mengurangi mutu kitosan yang dihasilkan, bahkan lebih baik jika dilihat dari parameter harga DD. Data harga DD kitosan tipe DMA dan DPMA ini juga dapat dimanfaatkan untuk tujuan penghematan pemakaian larutan NaOH, karena ternyata tanpa melalui tahap deproteinasi yang berarti menghemat pemakaian larutan NaOH ternyata harga DD kitosan yang dihasilkan tidak turun bahkan meningkat. Sejalan dengan upaya penghematan penggunaan larutan NaOH dalam proses isolasi kitosan, Ariyanti S.D & Yusro N.F (2006) melaporkan bahwa penggunaan berulang larutan NaOH dalam proses deasetilasi kitin menjadi kitosan relatif tidak mempengaruhi harga DD.

Efek Penghilangan Tahap Demineralisasi terhadap Derajat Deasetilasi Kitosan. Harga derajat deasetilasi (DD) kitosan tipe DPA ternyata lebih kecil dibandingkan dengan harga DD kitosan tipe DPMA, walaupun selisihnya hanya sekitar 5,3 poin. Hal ini menunjukkan bahwa penghilangan tahap demineralisasi pada proses isolasi kitosan dari cangkang kepiting dapat mengakibatkan penurunan harga DD. Selain lebih rendahnya harga DD kitosan tipe DPA dibandingkan DPMA, kemungkinan juga sifat-sifat fisika dan kimia serta aktivitas biologisnya juga berbeda karena jika dilihat dari spektra IRnya ternyata kitosan tipe DPA memiliki spektra IR yang paling berbeda dibandingkan dengan kitosan tipe DPMA dan DMA

c. Viskositas

Viskositas atau kekentalan merupakan salah satu sifat karakterisasi dari polimer. Larutan kitosan merupakan senyawa kimia berupa rantai-rantai polimer yang mempunyai viskositas tinggi. Informasi mengenai viskositas kitosan berhubungan dengan aplikasinya. Dalam bidang farmasi diperlukan kitosan dengan viskositas rendah, sedangkan untuk keperluan pengental atau penguat bahan makanan diperlukan kitosan dengan viskositas tinggi.

Viskositas larutan kitosan dalam larutan asam asetat 3% dengan berbagai konsentrasi hasil pengukuran disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Viskositas Kitosan

No	Kitosan	Viskositas (cPs)
1	DPMA	96,33
2	DMA	89,67
3	DPA	97,75

Viskositas ketiga larutan kitosan dalam larutan asam asetat 3% dalam berbagai konsentrasi tersebut berkisar antara 89,67 – 97,75 cPs. Nilai viskositas ini termasuk dalam kategori viskositas rendah (Lab. Protan 1987).

Viskositas larutan kitosan selanjutnya dapat digunakan untuk menghitung berat molekul (*Molecular Weight, MW*) kitosan. Rinaudo & Domand (1989) dalam Ariyanti S.D & Yusro N. F (2006) menyatakan bahwa viskositas kitosan berbanding lurus dengan berat molekulnya. Kitosan dengan berat molekul tinggi mempunyai viskositas yang tinggi pula, begitu pula sebaliknya.

Efek Penghilangan Tahap Deproteinasi terhadap Viskositas Kitosan.

Berdasarkan data viskositas larutan kitosan pada Tabel 3 di atas, jika dilihat pada kitosan DPMA dan DMA, maka terlihat bahwa harga viskositas larutan kitosan DPMA lebih besar daripada DMA (DPMA (96,33 cPs) > DMA (89,67 cPs)). Hal ini menunjukkan bahwa penghilangan tahap deproteinasi pada proses isolasi kitosan dapat menurunkan viskositas larutan kitosan yang dihasilkannya. Atau dengan kata lain kitosan yang diperoleh melalui tahap-tahap isolasi yang lengkap

(deproteinasi, demineralisasi, dan deasetilasi) akan menyebabkan viskositasnya menjadi lebih besar.

Viskositas merupakan ukuran kekentalan suatu fluida (cairan). Jika suatu cairan polimer mempunyai viskositas yang lebih besar, maka berarti cairan tersebut berisi polimer yang mempunyai rantai polimer yang lebih panjang. Dalam kasus viskositas kitosan tipe DPMA yang lebih besar daripada kitosan tipe DMA walaupun selisihnya cukup kecil, menunjukkan kalau rantai polimer kitosan DPMA lebih panjang dibandingkan rantai polimer kitosan tipe DMA. Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan larutan NaOH 50% pada proses deasetilasi lebih efektif memutuskan gugus asetil dari kitin DPMA. Sedangkan pada proses deasetilasi kitin DMA, larutan NaOH 50% lebih cenderung memotong rantai utama kitin sehingga menghasilkan kitosan DMA dengan rantai polimer yang pendek dan berat molekul rendah.

Efek Penghilangan Tahap Demineralisasi terhadap Viskositas Kitosan. Berdasarkan data viskositas larutan kitosan pada Tabel 3 di atas, jika dilihat pada kitosan DPMA dan DPA, maka terlihat bahwa harga viskositas rata-rata larutan kitosan DPMA lebih kecil daripada DPA (DPMA (96,33 cPs) < DPA (97,75 cPs)). Hal ini menunjukkan bahwa penghilangan tahap demineralisasi pada proses isolasi kitosan dapat menaikkan viskositas larutan kitosan yang dihasilkannya. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Nadarajah, K (2005) bahwa viskositas kitosan mengalami pengurangan seiring dengan bertambahnya waktu proses demineralization.

Viskositas kitosan tipe DPA yang lebih tinggi dibandingkan kitosan tipe DPMA menunjukkan bahwa penggunaan larutan NaOH 50% pada proses deasetilasi lebih efektif dalam memotong gugus asetil dari kitin. Akibatnya, kitosan yang dihasilkan memiliki rantai polimer yang cukup panjang dan mempunyai berat molekul cukup tinggi.

d. Kadar Air

Pengujian kadar air dari kitosan tipe DPMA, DMA, dan DPA bertujuan untuk mengetahui banyaknya kandungan air yang terhidrat pada rantai kitosan, karena kitosan bersifat sangat higroskopis. Dengan

dilakukan uji kadar air, maka akan terlihat perbedaan sifat hidroskopis dari masing-masing kitosan tersebut.

Kadar air yang terkandung di dalam serbuk kitosan dinyatakan sebagai H₂O yang terikat pada gugus-gugus fungsional polimer kitosan terutama gugus amina (-NH₂), N-asetil dan hidroksi (-OH) melalui ikatan hidrogen. Hasil uji kadar air dari kitosan tipe DPMA, DMA, dan DPA sebagaimana tersaji pada Tabel 4.

Berdasarkan Tabel 4 di atas, tampak kitosan tipe DMA memiliki kadar air yang paling tinggi, yaitu 11,67%. Hal itu dikarenakan kitosan tipe DMA yang dalam proses isolasinya tidak melalui tahap deproteinasi menyebabkan kandungan proteinnya masih banyak, dimana gugus peptidanya sangat potensial mengikat H₂O. Sedangkan kitosan tipe DPA memiliki kadar air yang paling kecil, yaitu 3,735% kemungkinan disebabkan karena masih adanya mineral-mineral logam yang berikatan dengan gugus-gugus amina, N-asetil maupun hidroksil sehingga menghalangi terjadinya ikatan hidrogen antara gugus-gugus fungsional tersebut dengan air. Sementara itu kitosan tipe DPMA posisinya berada di tengah-tengah antara DMA dan DPA, yaitu mempunyai kadar air sebesar 7,425%. Kitosan tipe DPMA merupakan kitosan yang proses isolasinya melalui tahap lengkap (deproteinasi, demineralisasi, dan deasetilasi), sehingga besarnya kadar air kemungkinan disebabkan oleh terjadinya ikatan hidrogen antara gugus-gugus amina (-NH₂), N-asetil, dan hidroksi (-OH) dengan molekul H₂O.

Tabel 4. Uji Kadar Air Kitosan

No	Tipe Kitosan	Kadar Air (%)
1	DPMA	7,425
2	DMA	11,67
3	DPA	3,735

Hasil uji kadar air ini menunjukkan bahwa penghilangan tahap deproteinasi pada isolasi kitosan dari cangkang kepiting menghasilkan kitosan yang bersifat lebih hidroskopis karena terjadi ikatan hidrogen antara molekul H₂O dengan gugus-gugus amina (-NH₂), N-asetil dan hidroksi (-OH). Di samping itu kemungkinan juga terjadi ikatan hidrogen antara molekul H₂O dengan gugus peptide pada protein yang masih terikat pada polimer kitosan tipe DMA. Sedangkan penghilangan tahap

demineralisasi pada isolasi kitosan menghasilkan kitosan yang sifat higroskopisnya paling rendah karena kemungkinan keberadaan mineral-mineral logam menghalangi gugus-gugus fungsional amina (-NH₂), N-asetil dan hidroksi (-OH) mengadakan ikatan hidrogen dengan molekul-molekul H₂O.

Urutan besar kecilnya kadar air yang terkandung pada setiap tipe kitosan yang diperoleh jika dikaitkan dengan spektra infra merah (spektra IR), ternyata sesuai dengan urutan tinggi rendahnya intensitas puncak serapan pada bilangan gelombang 3448,5 cm⁻¹ yang merupakan puncak serapan gugus -OH. Pada penelitian ini diperoleh urutan kadar air kitosan adalah DMA (11,670%) > DPMA (7,425%) > DPA (3,735%), sedangkan urutan intensitas puncak serapan IR pada bilangan gelombang 3448,5 cm⁻¹ dari kitosan yang diperoleh adalah DMA (24,497%) > DPMA (18,095%) > DPA (13,184%). Hasil penelitian ini tidak sesuai dengan hasil penelitian Brugnerotto *et al* (2001) yang mengamati spektra IR dari kitosan basah dan kitosan kering. Brugnerotto *et al* (2001) menyimpulkan bahwa kandungan air sampel kitosan tidak berpengaruh pada pelebaran puncak serapan gugus -OH pada bilangan gelombang 3350 cm⁻¹. Kesimpulan yang sama dengan kesimpulan Brugnerotto *et al* (2001) juga pernah diungkapkan oleh Domszy dan Robert (1985) dalam Brugnerotto *et al* (2001).

Perbedaan hasil penelitian ini dengan temuan Domszy dan Robert (1985) dan Brugnerotto *et al* (2001) kemungkinan disebabkan oleh perbedaan sampel kitosannya. Pada penelitian ini sampel kitosannya memang berbeda karena walaupun bahan dasarnya sama-sama dari cangkang kepiting tarakan, tetapi proses isolasinya melalui tahap-tahap yang berbeda. Jadi kitosan tipe DPMA, DMA, dan DPA memang berbeda sifatnya. Sedangkan penelitian Domszy dan Robert (1985) dan Brugnerotto *et al* (2001) menggunakan sampel kitosan yang sama, hanya kondisi kadar airnya saja yang berbeda.

e. Kadar Abu

Abu merupakan indikasi dari komponen senyawa anorganik yang terkandung dalam cangkang kepiting. Cangkang kepiting berisi kalsium karbonat dan kalsium phasfat. Kadar abu dari kitosan dilakukan secara

gravimetri dengan pemanasan suhu 500-550°C. Kadar abu merupakan ukuran keberhasilan proses demineralisasi pada pembuatan kitin. Semakin rendah nilai kadar abu, tingkat kemurnian kitosan yang dihasilkan semakin tinggi. Hasil dari uji kadar abu kitosan berbagai tipe disajikan dalam Tabel 5.

Tabel 5. Kadar Abu Kitosan

No	Tipe Kitosan	Kadar Abu (%)
1	DPMA	Nihil
2	DMA	1,60
3	DPA	46,85

Berdasarkan Tabel 5 di atas, terlihat bahwa kadar abu kitosan DPMA nihil atau tidak terdeteksi. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh terlalu sedikitnya kadar abu dari kitosan DPMA atau memang terlalu sedikitnya sampel yang diuji. Dari perbandingan ketiga hasil uji kadar abu, dapat diperkirakan kalau kitosan DPMA memiliki kadar abu paling kecil, yaitu di bawah kadar abu kitosan tipe DMA. Karena selama proses isolasinya kitosan DPMA melalui tahap penghilangan protein dan mineral maka komponen senyawa anorganik yang masih terkandung dalam kitosan DPMA paling sedikit. Atas dasar ini, maka diperkirakan kadar abu kitosan tipe DPMA kurang dari 1,60%.

Walaupun uji kadar abu kitosan DPMA tidak memperoleh hasil, kadar komponen senyawa anorganik yang terkandung dalam kitosan masih dapat diketahui dari hasil uji kadar Ca. Dari uji kadar Ca akan dapat diketahui persentase banyaknya senyawa anorganik, khususnya senyawa-senyawa kalsium yang terkandung dalam kitosan.

Kadar abu terbesar dimiliki oleh kitosan tipe DPA sebesar 46,85%. Hal ini menunjukkan bahwa kadar komponen senyawa anorganik, terutama senyawa kalsium paling banyak dibandingkan kitosan lain. Hasil ini dapat dimaklumi karena kitosan tipe DPA ketika proses isolasinya tidak melalui tahap demineralisasi sehingga mineral-mineralnya, terutama mineral kalsium tidak hilang.

Sedangkan kitosan tipe DMA memiliki kadar abu di posisi tengah-tengah antara kitosan DPMA dan DPA yaitu sebesar 1,60%. Kitosan tipe DMA memiliki kadar abu di atas kitosan DPMA dan di bawah kitosan DPA menunjukkan kalau kadar komponen senyawa anorganik yang

terkandung dalam kitosan DMA masih ada walaupun jumlahnya relatif kecil. Hal ini kemungkinan dikarenakan kitosan DMA tidak melalui tahap penghilangan protein (deproteinasi) sehingga masih mengandung protein dan protein-protein tersebut mengikat mineral-mineral anorganik, terutama mineral kalsium. Walaupun telah dilakukan tahap demineralisasi, mineral-mineral Ca tidak semuanya dapat hilang, karena mineral-mineral yang terikat pada protein lebih sukar hilang dibandingkan dengan yang tidak terikat pada protein. Jadi keberadaan protein dalam kitosan DMA kemungkinan ikut andil dalam menyokong besarnya kadar abu kitosan DMA.

f. Kadar Ca

Cangkang kepiting banyak mengandung mineral kalium, terutama kalsium karbonat dan kalsium fosfat. Oleh karena itu pengukuran kadar mineral kalsium dalam kitosan perlu dilakukan untuk mengetahui seberapa efektif tahap demineralisasi dalam menghilangkan mineral-mineral dalam cangkang kepiting. Selain itu juga untuk melihat bagaimana pengaruh penghilangan tahap demineralisasi terhadap pengurangan kadar mineral Ca dalam kitosan yang diperoleh.

Secara teori, kitosan yang diperoleh melalui tahap demineralisasi pasti memiliki kadar kalsium yang lebih rendah dibandingkan dengan kitosan yang diperoleh tanpa tahap demineralisasi. Ternyata teori ini benar karena fakta pada Tabel IV.xx membuktikan bahwa kitosan tipe DPMA memiliki kadar Ca yang paling rendah yaitu sebesar 0,1215%. Data kadar Ca kitosan DPMA sebesar 0,1215% dan merupakan kadar Ca paling kecil dibandingkan dengan kitosan DMA dan DPA mendukung dan memperkuat hasil uji kadar abu yang tidak terdeteksi, tetapi diperkirakan memiliki kadar abu paling kecil. Ternyata perkiraan tersebut benar karena hasil uji kadar Ca membuktikan hipotesis tersebut. Data ini juga membuktikan bahwa tahap demineralisasi cangkang kepiting dengan menggunakan larutan HCl 1 M pada suhu kamar belum sepenuhnya mampu menghilangkan mineral-mineral yang ada dalam cangkang kepiting karena ternyata mineral Ca masih ada walaupun kadarnya relatif kecil.

Kitosan tipe DMA yang memiliki kadar Ca sebesar 1,0715% dan menempati posisi di tengah-tengah antara kitosan DPMA dan DPA. Data uji kadar Ca kitosan DMA ini yang menempati posisi tengah-tengah ternyata juga sesuai dengan data uji kadar abu kitosan DMA. Fakta data uji kadar Ca kitosan tipe DMA ini menunjukkan bahwa walaupun kitosan tipe DPMA dan DMA sama-sama diperoleh melalui tahap demineralisasi, ternyata kitosan tipe DPMA memiliki kadar Ca yang lebih rendah daripada DMA. Hal ini menunjukkan bahwa penghilangan tahap deproteinasi mampu mengurangi hilangnya mineral yang lepas saat proses demineralisasi. Masih banyaknya kadar mineral Ca dalam kitosan tipe DMA kemungkinan karena dalam kitosan ini masih mengandung protein karena protein dalam kitosan ini tidak dihilangkan. Lebih sulitnya sebagian mineral Ca lepas dari matrik polimer kitosan DMA kemungkinan karena ada sebagian mineral Ca terikat pada struktur protein, sehingga yang hilang pada saat demineralisasi hanya mineral-mineral Ca yang tidak terikat pada struktur protein.

Kadar mineral Ca kitosan tipe DPMA lebih kecil daripada DMA karena kandungan protein kitosan tipe DPMA lebih sedikit dibandingkan DMA sehingga mineral Ca yang terikat pada protein juga sedikit sehingga ketika dilakukan tahap demineralisasi mineral-mineral Ca yang tidak terikat pada protein akan hilang. Jadi mineral Ca yang tidak terikat pada protein pada kitosan tipe DPMA lebih banyak dibandingkan pada kitosan tipe DMA sehingga mineral Ca yang lepas pada saat demineralisasi pada kitosan DPMA juga lebih banyak daripada DMA.

Kitosan tipe DPA memiliki kadar mineral Ca yang paling banyak, yaitu sebesar 14,6235%, dan data ini juga mendukung data uji kadar abu dimana kadar kitosan DPA menempati posisi paling tinggi dan besarnya kadar abu kitosan DPA jauh di atas kitosan lain. Data ini menunjukkan bahwa sekitar 15% berat kitosan DPA merupakan komponen dari mineral-mineral Ca. Kadar mineral Ca kitosan DPA jauh lebih besar dibandingkan dengan kitosan DPMA dan DMA karena kitosan DPA tidak melalui tahap demineralisasi sehingga mineral-mineral Ca yang ada dalam matrik cangkang kepiting masih utuh.

Tabel 6. Kadar Mineral Ca Kitosan

No	Tipe Kitosan	Kadar Mineral Ca (%)
----	--------------	----------------------

1	DPMA	0,1215
2	DMA	1,0715
3	DPA	14,6235

Berdasarkan hasil uji kadar abu dan kadar Ca kitosan DPMA, DMA, maupun DMA, ternyata kedua data tersebut ada kesesuaian dan saling mendukung satu sama lain. Jadi dapat disimpulkan bahwa penghilangan tahap deproteinasi pada proses isolasi kitosan dari cangkang kepiting mampu mengurangi hilangnya mineral-mineral yang terkandung dalam sampel kitosan, sedangkan penghilangan tahap demineralisasi menyebabkan keberadaan mineral-mineral dalam sampel kitosan tidak hilang.

SIMPULAN

Berdasarkan pembahasan di atas, maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Penghilangan tahap deproteinasi dapat meningkatkan nilai derajat deasetilasi, sedangkan penghilangan tahap demineralization menurunkan nilai derajat deasetilasi kitosan.
2. Penghilangan tahap deproteinasi dapat menurunkan viskositas, sedangkan penghilangan tahap demineralisasi menaikkan viskositas.
3. Penghilangan tahap deproteinasi dapat meningkatkan kadar air, sedangkan penghilangan tahap demineralisasi dapat menurunkan kadar air.
4. Penghilangan tahap deproteinasi meningkatkan kadar abu, sedangkan penghilangan tahap demineralisasi dapat meningkatkan kadar abu.
5. Penghilangan tahap deproteinasi meningkatkan kadar mineral Ca, sedangkan penghilangan tahap demineralisasi dapat meningkatkan kadar mineral Ca

DAFTAR PUSTAKA

- Dewi, A.S dan Fawzya, Y.N. 2006. Studi Pendahuluan: Penggunaan Berulang Larutan Natrium Hidroksida dalam Pembuatan Kitosan. Prosiding Seminar Nasional Himpunan Kimia Indonesia. IPB Bogor.
- Hiroshi Sano et al. 2002. Effect of Molecular Mass and Degree of Deacetylation of Chitosan on Adsorption of Streptococcus Sobrinus 6715 to Saliva Treated Hydrxyapatite. Bull. Tokyo dent.Coll. 43 (2) 75-82. May 2003

- Hiroaki Sato et al. 1998. Determination of the Degree of Acetylation of Chitin/Chitosan by Pirolisis-Gas Cromatography in the Presence of Oxalic Acid. *Anal. Chem*, 70 : 7-12.
- Kathleen Van de Velde and Paul Kiekens. 2004. Structure Analysis and Degree of Substitution of Chitin, Chitosan and Dibutrylchitin by FT-IR spectroscopy and solid state ¹³C NMR. *Carbohydrate Polimers*, 58 : 409-416.
- Khan, Tanveer Ahmad, Kok Khiang Peh and Hung Seng Ch'ng. 2002. Reporting degree of deacetylation values of chitosan : the influence of analytical methods. *J. Pharm Pharmaceut .Sci*, 5 (3) 205-212.
- Kwon T.Hwang et al. 2002. Controlling Molecular Weight and Degree of Deacetylation of Chitosan by Response Surface Methodology. *Abstract. Agric.Food Chem*. 50 (7) 1876-1882.
- Liu, Nan., Xi-Guang Chen., Hyung-Jin Park., Chen-Guang Liu., Cheng-Sheng Liu., Xiang-Hong Meng., and Le-Jun Yu. 2006. Effect of MW and Concentration of Chitosan on Antibacterial Activity of Escherichia Coli. *Carbohydrate Polymer*. 64 : 60-65
- M. Lavertu et al. 2003. A Validated ¹H NMR Method for the Determination of the Degree of deacetylation of Chitosan. *J. Pharm. Biomed. Anal*, 32 : 1149-1158.
- Nandor Balazes and Pal Sipos. 2007. Limitations of Ph-potentiometric Titration for the Determination of the Degree of Deacetylation of Chitosan. *Carbohydrate Research*, 342 : 124-130
- Shari Baxter, Svetlana Zivanovic, and Jochen Weiss. 2005. Molecular weight and Degree of Acetylation of High-Intensity Ultrasonicated Chitosan. *Food Hydrocolloids*, 19 : 821-830.
- Shepherd,R., S. Reader and A. Falshaw. 1997. Chitosan functional Properties. *Glycoconjugate Journal*. 14 : 535-542
- Tan, S.C., Khor,E.,Tan,T.K., and Wong, S.M. 1998. The Degree of Deacetylation of Chitosan : Advocating the First derivative UV-spectrophotometry metod of determination. *Talanta* 45 : 713-719.
- Weijun Ye et al. 2005. Novel core-shell particles with poly(n-butyl acrylate) cores and chitosan shells as an antibacterial coating for textiles. *Polymer* 46: 10538-10543.
- Yaghobi, N and Mirzadeh,H. 2004. Enhancement of Chitins Degree of Deacetylation by Multistage Alkali Treatments. *Iranian Polymer Journal*. 13 (2), 131-136.
- Yongqin Zhang et al. 2005. Determination of the Degree of deacetylation of Chitin and Chitosan by X-Ray powder Diffraction. *Carbohydrate Research*, 340 : 1914-1917.
- Yanming, DONG et al. 2001. Determination of Degree of Substitution for N-Acylated Chitosan using IR Spectra. *Science in China (Series B)*, Vol.44 No. 2