

SINTESIS KHITOSAN BERAT MOLEKUL RENDAH DARI LIMBAH UDANG PUTIH (*Penaeus merguensis*) MELALUI PROSES HIDROLISIS ENZIMATIS DENGAN PAPAN DAN UJI AKTIVITAS TERHADAP BAKTERI *Staphylococcus epidermidis*.

Endang Susilowati¹⁾, M.Masykuri¹⁾, Maryani²⁾, Atik Pujirahayu¹⁾

¹⁾Program Studi Pendidikan Kimia PMIPA FKIP UNS

²⁾Lab. Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UNS

Email: endwati@yahoo.co.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk: 1) mensintesis khitosan dan khitosan berat molekul rendah dari limbah udang putih (*Penaeus merguensis*) 2) mengkarakterisasi khitosan dan khitosan berat molekul rendah, 3) menguji aktivitas khitosan berat molekul rendah terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis*.

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen. Sintesis khitosan dilakukan melalui proses deproteinasi, demineralisasi, dan deasetilasi. Selanjutnya dilakukan Karakterisasi terhadap khitosan yang meliputi rendemen, kadar air, kadar abu, berat molekul, daya ikat air, daya ikat lemak, kelarutan, viskositas, derajat polimerisasi, derajat deasetilasi, dan struktur menggunakan FTIR. Sintesis khitosan berat molekul rendah dilakukan melalui proses hidrolisis secara enzimatis menggunakan enzim papain. Karakterisasi khitosan berat molekul rendah dilakukan dengan menghitung rendemen, berat molekul, derajat polimerisasi, derajat deasetilasi, dan struktur menggunakan FTIR. Uji aktivitas antibakteri khitosan berat molekul rendah dilakukan terhadap bakteri *S. epidermidis* dilakukan menggunakan metode difusi.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa: 1) Khitosan dapat disintesis dari limbah udang putih melalui proses deproteinasi, demineralisasi, dan deasetilasi. 2) Karakteristik fisik khitosan yang dihasilkan adalah rendemen 52,82%, kadar air (2,3±0,1)%, kadar abu 4,038%, berat molekul 2.679,57 g/mol, daya ikat air (590±21,3)%, daya ikat minyak (569±4,29)%, kelarutan (28±3,2)%, viskositas (1,33 ± 0,04) cp, derajat polimerisasi 16,627, dan derajat deasetilasi 82,72% dan karakteristik fisik khitosan berat molekul rendah. 3) Khitosan berat molekul rendah dapat disintesis dengan cara hidrolisis enzimatis menggunakan enzim papain. 4) Karakteristik khitosan berat molekul rendah meliputi rendemen 60%, berat molekul 2.401,80 g/mol, derajat polimerisasi 14,903, dan derajat deasetilasi 83,71%. 5) Dari aspek struktur kimia, produk khitosan, Khitosan berat molekul rendah dapat dibuktikan dari analisis FTIR. 6) Uji aktivitas antibakteri khitosan berat molekul rendah terhadap bakteri *S. epidermidis* pada konsentrasi 0,4% memiliki daya hambat 8,71 mm, konsentrasi 0,6% memiliki daya hambat 10,38 mm dan konsentrasi 0,8% memiliki daya hambat 15,91 mm.

Kata Kunci: Limbah udang, khitosan, berat molekul rendah, hidrolisis, papain, antibakteri



PENDAHULUAN

Limbah udang merupakan sumber yang kaya akan khitin. Dalam limbah udang diperkirakan sebesar 40% – 60% adalah khitin. Khitin merupakan polimer kedua terbanyak di alam setelah selulosa. Struktur khitin dibangun oleh unit-unit monomer N-asetilglukosamin yang tersusun linear dengan ikatan glikosida pada posisi β -(1-4). Khitin ini dapat diproses secara kimiawi untuk membentuk khitosan.

Khitosan merupakan polimer alam heteropolisakarida linier derivat dari khitin, tersusun dari ikatan β -1,4-D-glukosamin dan N-asetil-D-glukosamin (dengan proporsi yang bervariasi (Carbrera & Cutsem, 2005)). Khitosan merupakan suatu polimer kationik, derivat dari khitin yang mana gugus asetil secara kimiawi atau enzimatis telah dihilangkan untuk membentuk suatu molekul yang memiliki satu gugus amino dan dua gugus hidroksil pada setiap cincin glukosa. Khitosan digunakan dalam berbagai bidang seperti agrikultur, penjernihan, dan pemurnian air atau minuman. Khitosan juga digunakan dalam bidang kosmetik, farmasi, imobilisasi sel, sebagai talk pada sarung tangan bedah, bahan pembuat benang pada bedah plastik, membran pertukaran ion, bahan khelat pada kromatografi, bahan koagulasi dan flokulasi (Salami 1998 dalam Triana Kusumaningsih dkk, 2004).

Pada saat ini, penelitian terhadap khitosan dan aplikasinya masih terus dilakukan. Salah satunya adalah sintesis khitosan dengan berat molekul rendah. Sintesis khitosan dengan berat molekul rendah dapat dihasilkan dengan iradiasi sonik dan hidrolisis secara kimiawi. Akan tetapi cara-cara tersebut menghasilkan khitosan dengan derajat polimerisasi (DP) yang rendah karena efisiensi yang rendah dan pemotongan yang acak. Menurut Cheng & Li, 2000 dalam Ariyanti & Yusro, 2006 menyatakan bahwa hidrolisis secara kimiawi proses produksinya lama, sulit dikontrol, beracun, dapat mengubah struktur produk, terlalu banyak menghasilkan monomer dan DP yang rendah (DP 2-5). Degradasi khitosan secara enzimatik adalah cara yang lebih baik untuk mendapatkan khitosan dengan derajat polimerisasi yang lebih tinggi (Meidina dkk, tanpa tahun). Beberapa jenis enzim yang dapat digunakan untuk menghidrolisis khitosan antara lain glikanase, protease, lipase, tannase dan papain. Kumar *et al*, (2007) menyebutkan bahwa khitosan dengan berat molekul rendah memiliki kisaran berat 5 sampai 10 kDa merupakan antibakteri, antijamur, hipopolidemik yang kuat.

Di sisi lain, kebutuhan zat antibakteri atau antibiotik makin meningkat. Hal ini disebabkan banyaknya antibakteri yang sudah resisten terhadap beberapa bakteri yang membahayakan bagi kesehatan. Salah satu bakteri yang dapat merugikan adalah *Staphylococcus Epidermidis*. Bakteri *S. Epidermidis* merupakan bakteri gram positif yang dapat hidup pada kulit dari saluran pernafasan bagian atas manusia serta di rongga mulut. Bakteri ini termasuk dalam flora normal karena meskipun sebagai parasit ia tidak mengganggu inangnya. Akan tetapi, bakteri ini akan menimbulkan penyakit jika habitat normalnya terganggu. Beberapa efek negatif dari *S. Epidermidis* antara lain dapat menyebabkan bau badan, infeksi protesa ortopedik dan sistem kardiovaskular.

Pada penelitian ini, dilakukan sintesis khitosan berat molekul rendah melalui proses hidrolisis enzimatik. Enzim yang digunakan untuk menghidrolisis



adalah enzim papain yang dapat memecah ikatan antar monomer dari khitosan. Khitosan berat molekul rendah ini diuji aktivitasnya terhadap bakteri *S. Epidermidis*.

METODE PENELITIAN

1. Alat yang digunakan

Alat-alat yang dipakai dalam penelitian ini terdiri dari: spektrometer FTIR, autoclave, peralatan gelas, pH meter, ayakan, Blander, viscosimeter, oven, Magnetik stirrer, seperangkat alat uji daya hambat bakteri.

2. Bahan yang digunakan

Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini terdiri dari: limbah udang putih (lokal), NaOH, HCl, CH₃COOH, enzim papain, Larutan Buffer Asetat, Kloramfenicol, bakteri *S. Epidermidis*, Muller Hinton Agar, Alkohol.

3. Cara Penelitian

a. Pembuatan Khitosan

Bahan baku berasal dari limbah udang windu dari pasar tadisional di Surakarta. Limbah udang dicuci dan dikeringkan. Selanjutnya di haluskan dan diayak dengan ukuran ayakan 80 - 100 mesh.. Ada 3 tahap proses perolehan khitosan yaitu deproteinasi, demineralisasi dan deasetilasi

b. Sintesis khitosan berat molekul rendah

Membuat larutan khitosan 5 gr/l dalam buffer asetat (CH₃COOH-CH₃COONa) pH 4,5. Membuat larutan enzim papain dengan konsentrasi 2 gr/l. Mencampur larutan khitosan dan enzim papain dengan perbandingan 4:1 kemudian membiarkan pada suhu kamar selama 20 jam. Larutan khitosan yang telah terdegradasi kemudian di autoklaf dan menyimpan pada suhu 4°C. Mensentrifuge khitosan terdegradasi pada 3000 rpm selama 15 menit. Mencuci khitosan berat molekul rendah hingga pH netral. Mengeringkan khitosan berat molekul rendah pada suhu 40°C.

d. Karakterisasi dan Uji aktivitas antibakteri

Karakterisasi produk khitosan 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 khitosan berat molekul rendah dilakukan dengan menghitung rendemen, berat molekul, derajat polimerisasi, derajat deasetilasi, dan struktur menggunakan FTIR. Uji aktivitas antibakteri khitosan berat molekul rendah dilakukan terhadap bakteri *S. epidermidis* menggunakan metode difusi dengan kloramfenicol sebagai antibakteri kontrol positif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Sintesis dan Karakterisasi Khitosan

Khitin diisolasi dari kulit, kepala, dan ekor udang putih (*Penaeus merguensis*). Proses isolasi khitin ini dilakukan melalui dua tahap, yaitu tahap deproteinasi dan demineralisasi. Selanjutnya adalah tahap deasetilasi. Tahap ini bertujuan untuk membentuk khitosan senyawa turunan dari khitin. Rendemen yang dihasilkan pada pembentukan khitosan adalah 58,82%.

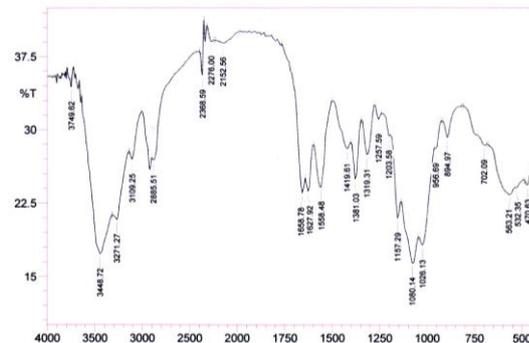


Hasil karakterisasi khitosan dapat dilihat pada Tabel 1. Dari Tabel 1 terlihat bahwa dari sifat fisiknya khitosan hasil memiliki karakter yang cukup baik.

Tabel 1. Karakterisasi Khitosan dari udang putih (*Penaeus merguensis*).

Karakterisasi Khitosan	Deskripsi
Kadar Air	(2,3±0,1)%
Kadar Abu	4,038 %
Berat Molekul	2.679,57 g/mol
Derajat Polimerisasi	16,627
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%

Hasil analisis terhadap struktur khitosan dapat dilihat pada Gambar 1 dan identifikasi puncak serapan FTIR dapat dilihat pada Tabel 2.



Gambar 1. Spektra FTIR pada produk Khitosan

Tabel 2. Identifikasi puncak serapan pada spektra FTIR

Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Gugus Fungsi
3448.72	-OH
3271.27	N-H amida
3109.25	-CH (aromatik)
2885.51	-CH
1658.78	C=O
1627.92	N-H
1419.61	C-C (aromatik)
1080.14	-C-O-

Dari spektrum pada Gambar 1 terlihat bahwa ada beberapa puncak khas yang menunjukkan ciri spesifik struktur khitosan. 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 khitosan pada sampel yang diuji.

2. Sintesis dan Karakterisasi Khitosan Berat Molekul Rendah

Pembentukan khitosan berat molekul rendah dapat dilakukan melalui reaksi kimiawi maupun reaksi enzimatik. Dalam penelitian ini reaksi dilakukan



secara enzimatik. Khitosan berat molekul rendah dibentuk melalui reaksi hidrolisis larutan khitosan menggunakan enzim papain. Dari 1 gram khitosan setelah dihidrolisis menghasilkan khitosan dengan berat molekul rendah dengan massa 0,6 gram. Jadi dapat disimpulkan bahwa rendemen dari hidrolisis enzimatik khitosan sebesar 60%.

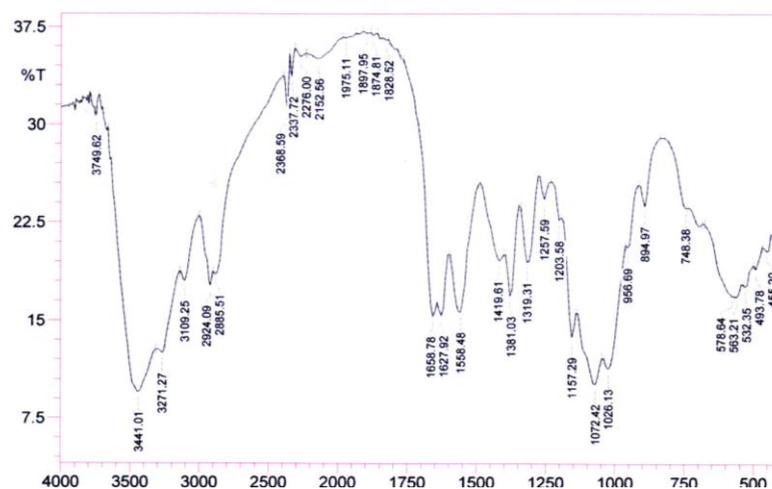
Khitosan berat molekul rendah dikarakterisasi meliputi berat molekul, derajat polimerisasi, derajat deasetilasi serta menganalisis gugus-gugusnya menggunakan FTIR. Hasil karakterisasi khitosan berat molekul rendah dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Karakterisasi Khitosan Berat Molekul Rendah

Karakterisasi Khitosan Berat Molekul Rendah	Deskripsi
Berat Molekul	2401,80 gr/mol
Derajat Polimerisasi	14,903
Derajat Deasetilasi	83,71%

Dari Tabel 3 terlihat bahwa khitosan berat molekul rendah memiliki berat molekul 2401,80 gram/mol yang lebih rendah dibandingkan khitosan yang memiliki berat molekul 2.679,57 g/mol. Ini berarti bahwa proses hidrolisis secara enzimatik dengan enzim papain telah mereduksi berat molekul sebesar 277,77 g/mol.

Sementara analisis terhadap struktur khitosan bisa dilihat pada spektra FTIR pada Gambar 2, dan identifikasi terhadap puncak serapan terlihat pada Tabel 4. Dari spektra FTIR terlihat bahwa struktur khitosan hidrolisis sama dengan khitosan, karena pada dasarnya proses hidrolisis hanya mengubah jumlah monomernya.



Gambar 2. Spektra Khitosan Berat Molekul Rendah

Tabel 4. Identifikasi puncak serapan pada spektra FTIR khitosan berat molekul rendah.

Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Gugus Fungsi
3441.01	-OH
3271.27	N-H amida
3109.25	-CH (aromatik)



Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Gugus Fungsi
2885.51	-CH
1658.78	C=O
1627.92	N-H
1419.61	C-C (aromatik)
1072.42	-C-O-

3. Uji Aktivitas Antibakteri

Khitosan berat molekul rendah 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. Hasilnya uji antibakteri yang dinyatakan dalam zona hambat (mm) dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil zona hambat uji antibakteri pada media MHA.

No	Sampel	Zona Hambat (mm)
1.	Larutan asam asetat 1% (kontrol negatif)	0
2.	Kloramfenikol 0,1 % (kontrol positif)	21,08
3.	Khitosan (0,8%)	8,04
4.	Khitosan berat molekul rendah (0,4%)	8,71
5.	Khitosan berat molekul rendah (0,6%)	10,38
6.	Khitosan berat molekul rendah (0,8%)	15,91

Uji antibakteri khitosan berat molekul rendah terhadap bakteri *S. epidermidis* dilakukan dengan menggunakan metode lubang atau *well diffusion method*. Agar yang tersuspensi oleh bakteri dituang ke dalam cawan petri hingga memadat kemudian dibuat lubang dengan diameter 6 mm. Pola penghambatan bakteri dapat dilihat berdasarkan zona bening yang terdapat disekitar lubang.

Menurut Elganjar (2001) dalam Maratus S (2009) 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. Berdasar Tabel 5, dari berbagai variasi konsentrasi khitosan berat molekul rendah dapat dikatakan bahwa sampel tergolong memiliki aktivitas yang kuat hal ini karena nilai diameter zona hambatnya lebih dari 8 mm, atau lebih dari 2 mm dari tepi sumuran. Semakin besar konsentrasi sampel, zona hambatnya pun semakin besar. Namun, belum dapat dikatakan bahwa konsentrasi 0,8% merupakan konsentrasi sampel yang optimum karena perlu variasi sampel lebih banyak lagi untuk menentukan konsentrasi optimum. Dari data yang diperoleh baru dapat dikatakan bahwa semakin besar konsentrasi sampel semakin berpengaruh terhadap keefektifan aktivitas antibakteri. Apabila dibandingkan dengan khitosan 0,8% yang memiliki zona hambat 8,04 mm dapat dikatakan bahwa khitosan berat molekul rendah memiliki aktivitas lebih tinggi. Sesuai dengan Ariyanti dan Yusro (2006) bahwa panjang rantai dan derajat deasetilasi khitosan diduga sebagai faktor penting yang mempengaruhi aktivitas biologis tersebut.

Khitosan berat molekul rendah dapat digunakan sebagai antibakteri karena mengandung adanya gugus polikation bermuatan positif yaitu NH₃⁺ bebas yang dapat mengikat muatan negatif pada permukaan sel bakteri dan membawa efek



antibakteri. *S. epidermidis* merupakan salah satu bakteri gram positif yang memiliki struktur dinding sel yang tebal dan berlapis tunggal.

Dari berbagai jenis agen antimikroba diketahui bahwa *S. epidermidis* yang merupakan bakteri gram positif yang telah resisten terhadap penisilin. Pada penelitian yang dilakukan ternyata bakteri ini masih dapat dihambat oleh kloramfenikol dan khitosan berat molekul rendah. Sehingga khitosan berat molekul rendah yang merupakan senyawa alami ini diharapkan dapat menjadi bahan antibakteri alternatif yang aman dan tidak memiliki efek samping terhadap kesehatan. Penelitian yang diperlukan selanjutnya adalah uji aktivitas antibakteri secara invitro terhadap hewan percobaan dan uji klinis terhadap manusia.

KESIMPULAN

Dari penelitian yang dilakukan diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Khitosan dapat disintesis dari limbah udang putih melalui proses deproteinasi, demineralisasi, dan deasetilasi.
2. Karakteristik fisik khitosan yang dihasilkan adalah rendemen 52,82%, kadar air $(2,3 \pm 0,1)\%$, kadar abu 4,038%, berat molekul 2.679,57 g/mol, daya ikat air $(590 \pm 21,3)\%$, daya ikat minyak $(569 \pm 4,29)\%$, kelarutan $(28 \pm 3,2)\%$, viskositas $(1,33 \pm 0,04)$ cp, derajat polimerisasi 16,627, dan derajat deasetilasi 82,72% dan karakteristik fisik khitosan berat molekul rendah.
3. Khitosan berat molekul rendah dapat disintesis dengan cara hidrolisis enzimatis menggunakan enzim papain.
4. Karakteristik khitosan berat molekul rendah meliputi rendemen 60%, berat molekul 2.401,80 g/mol, derajat polimerisasi 14,903, dan derajat deasetilasi 83,71%.
5. Dari aspek struktur kimia, produk khitosan, Khitosan berat molekul rendah dapat dibuktikan dari analisis FTIR.
6. Uji aktivitas antibakteri khitosan berat molekul rendah terhadap bakteri *S. epidermidis* pada konsentrasi 0,4% memiliki daya hambat 8,71 mm, konsentrasi 0,6% memiliki daya hambat 10,38 mm dan konsentrasi 0,8% memiliki daya hambat 15,91 mm.

DAFTAR PUSTAKA

- Ariyanti S Dewi dan Yusro Nuri F. 2006. *Kitosan Oligosakarida: Produksi dan Potensinya Sebagai Antibakteri*. Squalen Vol. 1 No 1: 29-33
- Bambang Srijanto, dkk. 2006. *Pengaruh Derajat Deasetilasi Bahan Baku Pada Depolimerisasi Khitosan*. Akta Kimindo Vol. 1 No 2.
- Cabrera, J.C., Cutsen, P.V. 2005. Preparation of Chitooligosaccharides with degree of Polymerization Higher than 6 by Acid or Enzymatic Degradation of Chitosan. *Biochemical Engineering Journal* 25: 165-172
- Jawetz *et al.* 1996. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran (EGC).



- 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
- Maratus Solichah. 2009. *Identifikasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri dari Daun Secang (Caesalpinia Sappan (L))*. F. MIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta.
- Meidina *et al.* 2005. *Aktivitas Antibakteri Oligomer Kitosan yang Diproduksi Menggunakan Kitonase dari Isolat B. Licheniformis MB-2*. Pascasarjana S2 Institut Pertanian Bogor.
- Puji Utami. 2009. *Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Metanol Daun Senggani (Melastoma candidum D.Don) terhadap Shigella sp Beserta Profil Kromatografi Lapis Tipisnya*. Seminar Kimia Program P.Mipa FKIP UNS.
- Triana Kusumaningsih dkk. 2004. *Karakterisasi Khitosan Hasil Deasetilasi Khitin dari Cangkang Kerang Hijau (Mytilus viridis linnaeus)*. *Jurnal Alchemy*, vol 3. No 1, 63-73.

