

C/PHP
2001
0126

**ISOLASI KHITOSAN DAN APLIKASINYA
SEBAGAI ZAT ANTIBAKTERI
DENGAN METODE *TOTAL PLATE COUNT* (TPC)**

Oleh:

SUNARDI

C03496005

Skripsi

Sebagai salah satu syarat untuk Memperoleh Gelar Sarjana
pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Institut Pertanian Bogor



**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
2001**

SKRIPSI

Judul Penelitian : Isolasi Khitosan dan Aplikasinya Sebagai Zat Antibakteri dengan Metode *Total Plate Count* (TPC)
Nama Mahasiswa : Sunardi
Nomor Pokok : C03496005
Program Studi : Teknologi Hasil Perikanan

Menyetujui ,

I. Komisi Pembimbing

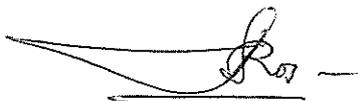


Dra. Pipih Suptijah, MBA.
Ketua



Ir. Komariah Tampubolon, MS.
Anggota

II. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB



Ir. Ruddy Suwandi, MS., Mphil.
Ketua Program Studi



Dr. Ir. Indra Jaya, MSc.
Pembantu/Dekan I

Tanggal lulus : 1 Mei 2001

RINGKASAN

SUNARDI C03496005. Isolasi Khitosan dan Aplikasinya Sebagai Zat Antibakteri Dengan Menggunakan Metode Total Plate Count (TPC). (Dibawah Bimbingan PIPIH SUPTIJAH dan KOMARIAH TAMPUBOLON).

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni sampai Oktober 2000 dilaboratorium Fisika Kimia dan Mikrobiologi Hasil Perikanan, Jurusan Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor.

Penelitian ini bertujuan mempelajari isolasi pembuatan khitosan untuk mendapatkan isolat khitosan yang baik sehingga diharapkan mampu dijadikan sebagai bahan antibakteri. Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *E. Coli* yang didapat dari biakan murni dari laboratorium Mikrobiologi Hasil Perikanan. Dalam penelitian ini didapat bakteri dengan pengenceran jumlah 10^{-6} dan 10^{-7} dengan hasil 1.33×10^8 koloni/ml dan $4,7 \times 10^8$ koloni/ml. Khitosan yang digunakan sebagai zat antibakteri menggunakan metode Suptijah *et al.*, (1992) dengan kandungan kadar air sebesar 8.67 %, kadar abu 0.11 %, kadar nitrogen 4.93 %, derajat deasetilasi 81.51 % dan viskositas 14.000,00 cps.

Pengujian antibakteri menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) dengan menghitung bakteri yang ditumbuhkan dalam beberapa konsentrasi khitosan. Konsentrasi khitosan yang digunakan dalam pengujian antibakteri *E. Coli* ini adalah 150 ppm, 175 ppm, 200 ppm, 250 ppm dan kontrolnya adalah 0 ppm dan asam asetat 2 %. Sedangkan metode penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) searah satu faktor dengan 6 perlakuan dan 2 ulangan. Sebagai perlakuan adalah konsentrasi khitosan dan faktornya adalah hari.

Hasil pengujian aktivitas antibakteri hari ke-1 menunjukkan bahwa senyawa antibakteri dari khitosan dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. Coli* yaitu adanya penurunan jumlah koloni bakteri. Jumlah koloni bakteri

pada kontrol tanpa perlakuan sebesar 3.0×10^8 koloni/ml. Sedangkan pada asam asetat sebesar 5.4×10^7 koloni/ml, konsentrasi 150 ppm sebesar 3.3×10^7 koloni/ml, konsentrasi 175 ppm sebesar 2.9×10^7 koloni/ml, konsentrasi 200 ppm sebesar 1.1×10^7 koloni/ml dan pada perlakuan ini bakteri bersifat bakteristatik. Sedangkan pada konsentrasi 250 ppm bakteri tidak dapat tumbuh lagi atau bersifat bakterisidal.

Hasil pengujian aktivitas antibakteri hari ke-3 menunjukkan bahwa jumlah koloni bakteri pada kontrol tanpa perlakuan sebesar 3.7×10^8 koloni/ml. Sedangkan pada asam asetat sebesar 8.3×10^7 koloni/ml, konsentrasi 150 ppm sebesar 4.7×10^7 koloni/ml, konsentrasi 175 ppm sebesar 2.9×10^7 koloni/ml, konsentrasi 200 ppm sebesar 1.7×10^7 koloni/ml dan pada perlakuan ini bakteri bersifat bakteristatik. Sedangkan pada konsentrasi 250 ppm bakteri tidak dapat tumbuh lagi atau bersifat bakterisidal.

Dari analisis ragam didapatkan hasil bahwa Fhit. lebih besar dari Ftab. yaitu 6.9302 berbanding 4.3874. Hal ini menunjukkan bahwa larutan khitosan memberikan pengaruh nyata terhadap penghambatan pertumbuhan bakteri *E. Coli*. Untuk uji lanjut menggunakan uji Tukey (BNJ) dengan selang kepercayaan 95 % adalah 26.879. Hasil ini menunjukkan bahwa pada perlakuan 0 ppm dan asam asetat; 0 ppm dan 150 ppm; 0 ppm dan 175 ppm; 0 ppm dan 200 ppm ; 0 ppm dan 250 ppm; asam asetat dan 175 ppm; 175 ppm dan 200 ppm; 175 ppm dan 250 ppm berbeda nyata. Sedangkan untuk 0 ppm dan 150 ppm; 0 ppm dan 200 ppm; asam asetat dan 175 ppm; asam asetat dan 200 ppm; asam asetat dan 250 ppm; 150 ppm dan 175 ppm; 150 ppm dan 200 ppm; 150 ppm dan 250 ppm; 200 ppm dan 250 ppm tidak berbeda nyata.

KATA PENGANTAR

Puji syukur Penulis ucapkan kehadiran Allah SWT karena atas segala rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan Skripsi ini. Dalam penelitian dan penulisan skripsi ini, penulis mendapatkan bantuan dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Ibu Dra. Pipih Suptijah, MBA sebagai ketua dan Ibu Ir. Komariah Tampubolon, MS sebagai anggota pembimbing yang telah banyak memberikan masukan, arahan dan motivasi dalam menyusun laporan ini.
2. Bapak Ir. Djoko Pernomo BSc. Sebagai penguji dalam ujian sidang dan ibu Desniar, Spi. sebagai moderator dalam Seminar atas masukan saran, kritiknya dalam mencapai kesempurnaan Skripsi ini.
3. Bapak dan mamak tercinta, nek Fit, Kak Irum, Bang Adi, Kakak Yanti Mas Edit dan kak Ros yang selalu sabar, ikhlas berkorban dan selalu mendoakan saya
4. Mbak Ema dan Mbak Kusti yang atas segala bantuannya dan saran-sarannya.
5. Kfitosan Team : Susi, Aam, Teguh, Tonggo dan Ipoel atas kerjasamanya.
6. Temen THP 33 dan 34 : Acoy, Dodo, Ribut, Sope, Izzah, Pipin, Riri, Inoenk, Acil, Polmaria dan semua temen yang tak bisa disebutkan satu persatu.

7. *Famili 123 : Abdoel, Taupik, Sugeng, Wahyan, Maman atas segala dukungannya dan kebersamaannya.*

8. *Sweet Com. and kru atas segala bantuan dan kerjasamanya.*

Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini kurang sempurna. . Meskipun demikian penulis berharap semoga tulisan ini dapat memberikan masukan-masukan yang bermanfaat bagi pihak-pihak yang memerlukannya.

Bogor, Mei 2001

Penulis

RIWAYAT HIDUP

Penulis adalah anak keempat dari empat bersaudara. Dilahirkan di Tanahjawa pada tanggal 25 Juni 1977 dari pasangan Bapak Tiran dan Ibu Rasmi. Pada tahun 1990 penulis menyelesaikan pendidikan dasar di SD negeri No. 091500 Tanahjawa, Simalungun, Sumatera Utara. Penulis menyelesaikan pendidikan menengah pertama pada SMP Negeri 1 Tanahjawa pada tahun 1993.

Tahun 1996 penulis menyelesaikan studi pada sekolah menengah atas di SMA Negeri Tanahjawa dan pada tahun yang sama penulis diterima di Institut Pertanian Bogor (IPB) pada Program Studi Teknologi Hasil Perikanan (THP), Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan melalui jalur Undangan Seleksi Masuk IPB (USMI).

Selama Pendidikan pernah mengikuti unit kegiatan pada Club Sepak Bola FPIK, pengurus Himasilkan. Penulis menyelesaikan skripsi dengan judul " **Isolasi Khitosan dan Apikasinya Sebagai zat Antibakteri dengan Metode *Total Plate Count* (TPC).**"

DAFTAR ISI

DAFTAR ISI	iii
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR LAMPIRAN.....	vii
1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	2
1.3 Waktu dan Tempat	3
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Sumber Khitin dan Khitosan	4
2.2 Isolasi Khitosan.....	5
2.3 Sifat Fisika Kimia Khitosan	9
2.4 Senyawa Aktif Antibakteri	10
2.5 Khitosan Sebagai Zat Antimikroba.....	12
2.6 Bakteri <i>Escherichia Coli</i>	13
3. METODOLOGI	
3.1 Bahan dan Alat	15
3.1.1 Alat	15
3.1.2 Bahan	15
3.2 Prosedur Kerja	16
3.2.1 Penelitian Pendahuluan.....	16
3.2.2 Pembuatan khitosan.....	16
3.2.3 Pembuatan larutan khitosan.....	16
3.2.4 Analisis khitosan	15
3.2.4.1 Kadar air.....	15
3.2.4.2 Kadar abu.....	17
3.2.4.3 Kadar total nitrogen.....	17
3.2.4.4 Derajat deasetilasi.....	17
3.2.4.5 Viskositas	17

3.2.5 Pengujian antibakteri berdasarkan jumlah TPC	18
3.2.5.1 Persiapan alat	
3.2.5.2 Pembuatan media dan perhitungan jumlah bakteri	18
3.2.5.2.1 Persiapan pengenceran	18
3.2.5.2.2 Pengenceran	18
3.2.5.2.3 Penuangan	19
3.2.5.2.4 Inkubasi	19
3.2.5.2.5 Perhitungan jumlah koloni bakteri.....	19
3.2.6 Metode penelitian	20
 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Pembuatan Khitosan.....	21
4.2 Analisis Khitosan.....	23
4.3 Hasil uji Antibakteri.....	27
4.3.1 Penelitian Pendahuluan	27
4.3.2 Penelitian Utama	27
 5. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan	31
5.2 Saran	32
 DAFTAR PUSTAKA	
 LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

No	Teks	Halaman
1.	Produksi udang tahun 1993-1995.....	3
2.	Standar mutu khitosan menurut Protan Laboratories	8
3.	Hasil dan analisis derajat deasetilasi, viskositas dan proksimat khitosan	22
4.	Jumlah koloni bakteri <i>Escherichia coli</i>	26

DAFTAR GAMBAR

No.	Teks	Halaman
1.	Proses pembuatan khitosan dari kulit udang	6
2.	Reaksi demineralisasi	7
3.	Struktur khitin	7
4.	Struktur khitosan	8
5.	Hubungan antara perlakuan khitosan terhadap jumlah koloni bakteri <i>Escherichia coli</i>	27

DAFTAR LAMPIRAN

No.	Halaman
1. Jumlah koloni bakteri <i>Escherichia coli</i> pada inkubasi pada inkubasi hari ke-1.....	35
2. Jumlah koloni bakteri <i>Escherichia coli</i> pada inkubasi pada inkubasi hari ke-3.....	36
3. Contoh perhitungan organisme per ml biakan.....	37
4. Rancangan acak lengkap satu faktor uji aktivitas antibakteri.....	38

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Usaha industri perikanan dewasa ini baik usaha penangkapan maupun pengolahan banyak menimbulkan hasil samping. Limbah udang yang berjumlah besar sampai saat ini belum diiringi dengan pemanfaatan secara maksimal.

Udang merupakan komoditi ekspor non migas andalan Indonesia, ditinjau dari segi harga maupun permintaan. Permintaan pasar akan komoditi ini umumnya cenderung mengalami peningkatan dari tahun ke tahun (Ilyas, 1983). Pengolahan udang untuk tujuan ekspor biasanya dalam bentuk beku setelah pemisahan kepala dan kulit. Organ ini merupakan bagian yang dibuang pada industri pengolahan udang.

Limbah yang berasal dari pembekuan udang bervariasi tetapi umumnya berkisar antara 30-75% dari berat udang tergantung jenisnya. Limbah padat yang berasal dari pengolahan udang berkisar antara 65-85%. Demikian juga dengan jumlah bagian yang terbuang berasal dari usaha pembekuan udang cukup tinggi. Limbah tersebut berupa kulit, kepala, ekor maupun kaki.

Pemanfaatan limbah pabrik pengolahan udang beku hingga saat ini umumnya dibuat sebagai kerupuk, petis, dan campuran pakan ternak. Namun jumlah yang dimanfaatkan tidak seberapa dibandingkan dengan jumlah yang ada. Di negara maju, seperti Amerika dan Jepang limbah udang dimanfaatkan dalam industri sebagai bahan dasar pembuatan khitin dan khitosan. Dalam industri modern penggunaan khitosan sangat luas antara lain semua turunannya dapat dimanfaatkan dalam bidang bioteknologi, industri pangan, pertanian, farmasi, kesehatan dan pengolahan limbah cair.

Limbah kulit udang ternyata mengandung senyawa khitin sebesar 25 %. Khitin mempunyai nama kimia 2-asetilamida -2-deoksi D-glukopiran, suatu polimer rantai panjang yang tidak bercabang dan tidak larut air serta tidak beracun atau tidak toksik. Khitin diperoleh melalui proses deproteinasi dan demineralisasi dari limbah kulit udang, sedangkan khitosan diperoleh melalui proses deasetilasi khitin.

Antimikroba adalah senyawa kimia yang dihasilkan secara alami misalnya kunyit, daun jambu, sirih maupun secara buatan misalnya fenol dan persenyawaan fenolat, alkohol, aldehid, halogen dan logam berat yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroba. Mekanisme antimikroba ada dua macam yaitu bakteriostatik dan bakterisidal. Mekanisme bakteriostatik yaitu menghambat sintesis protein dengan mengikat ribosom, sedangkan bakterisidal mencegah pertumbuhan dan menyebabkan kematian namun tidak menyebabkan bakteri lisis. Dengan meningkatnya pengetahuan tentang obat-obatan, maka pemusnahan bakteri mudah dilakukan.

Dalam bidang pengawetan atau pengolahan pangan telah digunakan zat kimia yang bersifat antiseptik. Penggunaan bahan-bahan tambahan termasuk antibiotik, antimikrobia dan antiomiotik, antijamur serta lainnya sudah meluas dan lazim dilakukan dalam pengawetan makanan. Zat kimia penghasil antimikroba ini diduga berbahaya bagi tubuh kita karena meninggalkan residu. Oleh karena itu Khitosan dapat diharapkan sebagai alternatif bahan antimikroba karena berasal dari alam dan tidak beracun. Pada saat ini berbagai antibiotik banyak diproduksi sintesis dan digunakan untuk melawan infeksi bakteri. Masalah yang timbul kemudian adalah karena banyak antibiotik yang kurang efektif akibat munculnya galur-galur bakteri patogen yang resisten terhadap antibiotik *Escherichia coli* multi resisten terhadap beberapa antibiotik.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mempelajari proses pembuatan khitosan dan mengaplikasikannya sebagai zat antibakteri *Escherichia coli* dengan menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) berdasarkan jumlah tumbuh.

1.3 Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan pada bulan Juni sampai Oktober 2000 di Laboratorium Fisika Kimia, dan Mikrobiologi Hasil Perikanan, Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sumber Khitin dan Khitosan

Sumber khitin dan khitosan yang cukup melimpah diperairan Indonesia adalah limbah udang. Hal ini sejalan dengan munculnya udang sebagai salah satu komoditi primadona dalam industri pengolahan hasil perikanan, sejak diresmikannya program peningkatan devisa non migas terutama dari sub sektor perikanan (Suptijah *et. al.*, 1992).

Salah satu produk perikanan yang diusahakan secara intensif dan bernilai ekonomis penting dalam perdagangan internasional adalah udang. Produksi udang dari tahun 1993–1997 dapat dilihat pada Tabel 1:

Tabel 1. Produksi udang dari tahun 1993–1997

Tahun	Produksi (ton/mt)
1993	174.881
1994	195.731
1995	203.411
1996	207.079
1997	238.521

Sumber : Ditjen Perikanan (1997)

Udang diklasifikasikan kedalam filum Arthropoda, kelas Crustacea dan bangsa Decapoda. Kemudian setiap jenis dibagi lagi atas famili dan spesies yang berbeda (Hadi dan Supriana, 1984).

Menurut Suptijah *et. al.*, (1992), bahwa limbah udang dikategorikan dalam tiga macam bentuk yaitu: limbah udang berupa kepala, yang biasanya hasil sampingan dari industri pembekuan udang, limbah berupa kulit atau tanpa kepala, juga merupakan hasil sampingan dari industri udang beku kualitas II atau industri pengalengan udang, dan yang terakhir adalah limbah campuran antara kulit dan kepala hasil sampingan dari industri pengolahan

udang. Produk khitosan yang dihasilkan berbeda-beda tergantung proses pengolahannya.

Secara umum udang terdiri dari 71.5-79.6 % air, 0.7-2.3 % lemak, dan 18-22% protein. Tubuh udang terbagi atas tiga bagian besar yaitu kepala dan dada (cephalotorax), badan (abdomen) dan ekor (uropod) (Hadi dan Supriana, 1984). Bagian kepala merupakan 36–39 % dari berat badan. Dalam ekspor udang, kulit keras (carapace), kepala dan ekor (uropod) merupakan bagian yang dibuang pada industri pembekuan udang (Arluis, 1991).

Menurut Knorr (1984), khitin dapat ditemukan pada limbah udang sebesar 13-15% dan rajungan 14-17%. Kerangka luar dari udang, kepiting, cumi-cumi, ikan sotong dan beberapa serangga dan mikroorganisme, telah lama menarik perhatian sebagai sumber pembuatan khitin.

Menurut Knorr (1984), dari sekian banyak sumber khitin hanya kulit udang yang sudah dimanfaatkan secara komersil. Khitosan diperoleh melalui proses deasetilasi yaitu penghilangan gugus COCH_3 dari khitin yang berasal dari gugus NHCOCH_3 menjadi gugus NH_2 . Gugus NH_2 ini merupakan polimer kationik yang dapat mengikat sel bakteri.

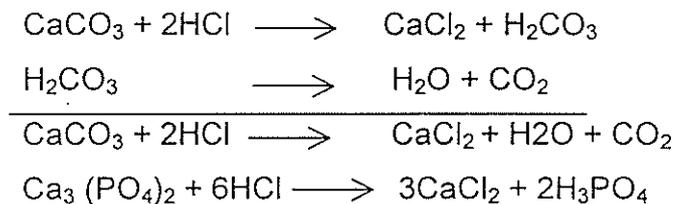
Khitosan merupakan suatu polimer yang berperan sebagai amino pengganti (*exchanger amino*), karena mengandung gugus amino dan gugus hidroksi yang bertindak sebagai donor elektron. (Bastaman, S. 1989)

2.2 Khitosan

Kulit udang mengandung senyawa kimia yang disebut khitin, dengan rumus molekul $(\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_5)_n$. Khitosan didapat dari khitin melalui proses deasetilasi. Sedangkan khitin diperoleh melalui proses demineralisasi dan deproteinasi. Demineralisasi yaitu proses penghilangan mineral yang dikandung kulit udang. Tahap ini dilakukan dengan mencampur HCl 1.5 N dengan perbandingan 1:7 yaitu satu 1 kg kulit udang dan 7 liter larutan HCl

1.5 N, kemudian dipanaskan pada suhu 90 °C. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 1.

Mineral utama pada kulit udang adalah CaCO₃ dan sedikit Ca₃ (PO₄)₂. Saat demineralisasi, senyawa kalsium akan bereaksi dengan HCl, menghasilkan kalsium klorida, asam karbonat dan asam fosfat yang larut dalam air. Reaksi demineralisasi dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 1. Reaksi demineralisasi menurut Bastaman (1989).

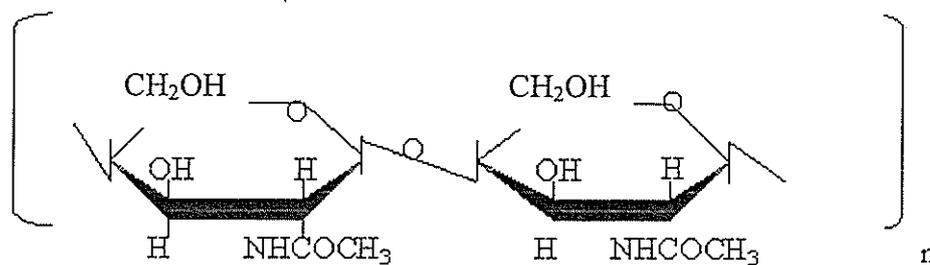
Setelah melalui proses demineralisasi dilanjutkan dengan tahap deproteinasi yaitu proses penghilangan protein dengan menggunakan larutan NaOH 3,5 N dengan perbandingan 1 : 10 pada suhu 90 °C selama satu jam. Protein yang terekstrak dalam bentuk Na-proteinat. Ion Na⁺ akan mengikat ujung rantai protein yang bermuatan (-) dan melarut dalam larutan pengestrak.

Tahap terakhir adalah proses deasetilasi yaitu penghilangan gugus asetil terhadap produk khitin dengan menggunakan larutan NaOH 50 % dengan perbandingan 1:20 pada suhu 140 °C selama 2 jam.

Proses ini bertujuan untuk menghilangkan gugus asetil (COCH₃) dari khitin. Suhu tinggi (140 °C) dan konsentrasi tinggi (50%) ini, berkaitan dengan ikatan kuat antara atom nitrogen pada gugus amin dengan gugus asetil. Selain itu, khitin termasuk salah satu polisakarida yang sangat sulit dihidrolisis air, sehingga harus dihidrolisis dalam suasana asam atau basa. Setiap tahap selalu diikuti proses pencucian dengan menggunakan aquades atau air bersih sampai dengan netral. Setelah dicuci untuk proses deasetilasi diikuti dengan proses pengeringan (Suptijah *et.al.*, 1992). Gambar 3 dan 4 adalah struktur khitin dan khitosan secara berulang.

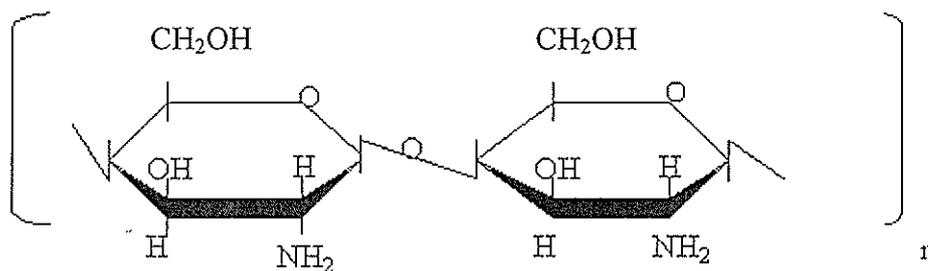


Gambar 2. Skema Proses Pembuatan Khitosan dari Kulit Udang (Suptijah *et. al.*, 1992)



Gambar 3. Struktur Berulang Khitin (Bough, 1975).

Menurut Chandkrachang *et al.*, (1991), khitosan merupakan produk alami yang tidak beracun dan polisakarida tidak larut air, yang diekstrak dari kulit udang. Disamping tidak beracun juga merupakan biopolimer kationik yang dapat didegradasi.



Gambar 4. Struktur Berulang Khitosan (Bough, 1975).

Khitosan dapat larut dalam larutan asam organik tetapi tidak larut dalam pelarut organik lainnya seperti dimetil sulfoksida, tidak larut dalam air dan pH 6.5, tetapi pelarut khitosan yang baik adalah asam asetat dengan konsentrasi 1–2 % (Anonymous dalam Arlius, 1991).

Bidang pemakaian, kualitas khitosan tergantung pada pemakaiannya, misalnya untuk proses pemurnian (non makanan) biasanya tidak memperdulikan mutunya sedangkan untuk produk kesehatan kualitasnya sangat dibutuhkan. Standar mutu khitosan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Standar Mutu Khitosan Menurut Protan Laboratories

Sifat	Parameter
Ukuran Partikel	Butiran/bubuk
Kadar air (%berat kering)	≤ 10%
Kadar abu (%berat kering)	≤ 2 %
Derajat deasetilasi	≥70%
Warna larutan	Jernih
Viskositas	
rendah	< 200
medium	200 – 799
tinggi	800-2000
ekstrak tinggi	>2000

Sumber : Chandkrachang *et al.*, (1991)

2.3 Sifat Kimia Khitin dan Khitosan

Khitin mempunyai bentuk molekul yang hampir sama dengan selulosa yaitu suatu bentuk polisakarida yang dibentuk dari molekul-molekul glukosa sederhana yang identik. Monomer-monomer khitin dibentuk oleh N - acetyl D - glukosamin (Ornum, 1992).

Khitin adalah polimer linier yang mempunyai berat molekul dari 2-asetamida 2-deoksi-D-glukopiranol atau suatu n-asetil D-glukosamin (Ornum, 1992). Khitin dan khitosan mudah mengalami degradasi secara biologis dan tidak beracun.

Rumus molekul khitin adalah $(C_8H_{13}NO_5)_n$ dengan perbandingan atom C = 47,29 %; atom H = 6,45 %; atom N = 6,89 % dan atom O = 39,37 %. Menurut Knorr (1984), khitosan merupakan produk deasetilasi khitin yang merupakan polimer rantai panjang glukosamin (2-amine-2-deoksiglukosa). Berat molekul khitosan tergantung dari degradasi yang terjadi pada pembuatan khitosan (Knorr, 1984). Pada proses deasetilasi

yang menghasilkan derajat deasetil besar yaitu $> 70\%$ maka akan menghasilkan berat molekul khitosan yang rendah dan memberikan daya hambat yang besar daripada khitosan yang mempunyai berat molekul yang besar.

Menurut Ornum (1992) gugus amino (NH_2) yang dimiliki oleh khitosan yang banyak memberikan kegunaan. Khitosan bila dilarutkan dalam asam akan menjadi polimer kationik dengan struktur linear. Pada kondisi asam, gugus amino bebas dari khitosan akan terprotonasi membentuk gugus amino kationik/ NH_3^+ (Sandford, 1989). Kation akan berinteraksi dengan anion polimer membentuk kompleks elektrolit (Hirano, 1989).

Menurut Hirano (1982), semakin banyak gugus asetil yang hilang dari polimer khitin, interaksi antara ion dengan hidrogen dari khitosan akan semakin kuat. Bentuknya yang spesifik dan mengandung asam amino dalam rantai karbonnya menyebabkan khitosan bermuatan positif, berbeda dengan polisakarida secara umum.

Menurut Bastaman (1989), khitosan sebagai suatu polimer dan dapat berperan sebagai amino pengganti (*amino exchanger*), karena khitosan mengandung gugus amino dan gugus hidroksil bertindak sebagai donor, khitosan dapat juga berinteraksi dengan zat-zat organik lainnya seperti protein.

2.4 Senyawa aktif Antibakteri

✓ Antibiotik adalah komponen antimikroba yang dihasilkan secara alami oleh organisme dan bersifat toksik bagi mikroalga, bakteri, fungi, virus atau protozoa (Metting dan Pyne, 1986). Senyawa antimikroba sendiri adalah senyawa kimia yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme (Brock dan Madigan, 1984) ✓

Bahan kimia yang dapat membunuh organisme disebut "sidal", misalnya bakterisidal, fungisidal, algasidal. Bahan bakterisidal merupakan

bahan kimia yang memiliki aktivitas membunuh bakteri sedangkan bahan kimia yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme tetapi tidak membunuh mikroorganisme tersebut disebut "statik", misalnya bakteristatik, fungistatik dan algastatik (Brock dan Madigan, 1984).

Senyawa antibakteri sebagai salah satu bahan antimikroba memiliki tiga macam bentuk kerja yaitu bakteristatik, bakterisidal dan bakteriolitik. Mekanisme kerja bakteristatik ialah menghambat sintesis protein dengan mengikat ribosom, sedangkan bakterisidal mencegah pertumbuhan dan menyebabkan kematian namun tidak menyebabkan sel bakteri menjadi lisis (pecahnya dinding sel). Berbeda dengan bakterisidal, bakteriolitik bekerja dengan cara membuat lisis sel-sel bakteri. Proses lisisnya sel bakteri terlihat dari penurunan jumlah sel ataupun kekeruhan setelah bahan tersebut ditambahkan (Brock dan Madigan, 1984). Kerja senyawa antibakteri dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain konsentrasi senyawa antibakteri yang digunakan, jumlah dan spesies, bakteri, suhu, keberadaan bahan organik lain dan pH (Pelczar dan Chan, 1988).

Senyawa antimikroba terbagi menjadi beberapa kelompok utama berdasarkan senyawa kimia penyusunnya, yaitu fenol dan persenyawaan fenolat, alkohol, aldehid, halogen, logam berat dan persenyawaan, deterjen dan kemolisator gas (Pelczar dan Chan, 1988).

Salah satu jenis senyawa antibiotik adalah *streptomycin*. *Streptomycin* dihasilkan oleh *Streptomyces griseus* dan tersusun atas tiga asam (triacid) dan memiliki BM 581.58. *Streptomycin* dapat larut dalam air dan merupakan garam yang mengandung sulfat, hidroklorida dengan kalsium klorida dan fosfat. *Streptomycin* sudah digunakan untuk kepentingan komersial dan memiliki daya hambat pada bakteri gram positif maupun gram negatif (Salle, 1961).

2.5 Khitosan Sebagai Antibakteri

Khitin (poly- β -(1-4)-N-Acetyl-D-Glucosamin) melimpah dialam dan tersebar luas yaitu pada organisme invertebrata laut (seperti udang, kepiting, cumi-cumi, ikan sotong), serangga dan jamur. Khitosan adalah khitin deasetilasi yang umumnya mengandung nitrogen lebih dari 7 %, tetapi ada juga lebih sedikit yang ditemukan pada dinding sel beberapa jamur. Karena muatan positif C - 2 dari monomer Glukosamin, khitosan lebih larut daripada khitin dan lebih baik aktivitas antimikrobanya (Knorr, D. 1986).

Interaksi antara tumbuhan jamur patogen telah menunjukkan bahwa khitosan telah bekerja hal ini ditunjukkan dengan menahan pertumbuhan jamur dan juga oleh banyak aktivitas respon pertahanan tumbuhan. Daya ikat khitosan kepada DNA inang tumbuhan dan membran biologis membuatnya menjadi agen antifungi yang potensial (Walker-Simmons *et al.*, 1983) Bagaimanapun, kecuali untuk melawan spesies *Fusarium*, aktivitas antifungi pada khitosan melawan kapang pengontaminasi makanan telah ditemukan hanya dengan konsentrasi yang tinggi. Ghaouth *et al.* menemukan bahwa konsentrasi minimal 3 mg/ml yang diperlukan untuk menahan atau menghambat germinasi spora *Brotrytis cinerea*. Persentasi penghambatan *Aspergillus niger* dan *Aspergillus parasitikus* oleh khitosan dengan konsentrasi 5 mg/ml yaitu masing-masing 41,1 % dan 63 %. Khitosan juga menunjukkan aktivitas bakteri melawan *Corynebacterium michigenenses*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, tetapi tidak efektif menghambat pertumbuhan *bacillus aureus*, *Erwinia spp* dan *Klebsiella pneumonia* (Seo, H.,K. Mitsunashi and H. Tanibe. 1992). Rendahnya berat molekul khitosan mempunyai daya efek daya hambat yang besar daripada khitosan yang mempunyai berat molekul yang besar untuk mencegah phytopatogen (Hirano. S, and N. Nagao, 1989).

Kelarutan dalam air merupakan faktor yang penting dalam aplikasi dan modifikasi bahan kimia yang diakhir proses dapat melibatkan alkoxy,

karbonmethylassi dan asylassi. Sekarang banyak turunan khitosan yang seperti karboksimethyl chitosan, 1-deoksi-1-glucit-1-yl-chitosan, 1-deoksi-1-lactit-1-yl chitosan, chitosan hidroglyumat, chitosan lactate, sulfuril chitin telah banyak dipelajari batas waktu antimikrobanya. (Papineau, *et al.*, 1991).

2.6 Bakteri *Escherichia coli*

Bakteri adalah sel prokariot yang khas dan bersifat uniseluler. Sel bakteri ada yang berbentuk seperti bola, batang, spiral. Umumnya bakteri berdiameter 0.5-1.0 μm , dengan panjang antara 1,5-2,5 μm (Pelczar dan Chan, 1988).

Berdasarkan perbedaan pada komposisi dan struktur dinding selnya, bakteri dibedakan menjadi gram positif dan gram negatif. Bakteri gram positif mempunyai struktur dinding sel yang tebal antara 15 - 80 nm dan berlapis tunggal. Komposisi dinding sel terdiri dari lipid, peptidoglikan dan asam tekoat. Konsentrasi lipid pada dinding sel bakteri gram positif 1 - 4 %. Umumnya bakteri Gram positif lebih rentan terhadap penisilin dan persyaratan nutrisi relatif lebih rumit pada banyak spesies (Pelczar dan Chan, 1988).

Bakteri gram negatif mempunyai struktur sel yang lebih tipis, yaitu berkisar antara 10 - 15 nm dan berlapis tiga. Komposisi dinding selnya terdiri dari lipid dan peptidoglikan. Konsentrasi lipid bakteri gram negatif antara 11 - 22 %. Peptidoglikan beberapa didalam lapisan kaku sebelah dalam berjumlah 10 % dari berat kering sel. Bakteri gram negatif umumnya kurang rentan terhadap penisilin, kurang resisten terhadap gangguan fisik dan persyaratan nutrisinya relatif lebih sederhana. Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Escherichia coli*.

Escherichia coli merupakan bakteri gram negatif bersifat anaerobik fakultatif. Berbentuk batang pendek, berukuran 2,4 - 0,4 μm sampai 0,7 μm bersifat motil dan nonmotil dengan flagella petrikus. Kisaran suhu

pertumbuhannya adalah 10 - 40 °C dengan suhu optimum 37 °C dan pH pertumbuhan 6,0 - 8,0. Bakteri tumbuh mudah pada medium sederhana (Pelczar dan Chan,1988).

Bakteri tersebut merupakan penghuni normal dalam saluran pencernaan pada manusia dan hewan tetapi ada juga yang menyebabkan infeksi pada saluran pencernaan, sistem urinaria, darah, dan sistem syaraf pusat. *Escherichia coli* memiliki habitat hidup yang sangat luas yaitu perairan, tanah, makanan, air seni dan tinja (Ceupte1990 dalam Santoso 1999). *Escherichia coli* sangat sensitif terhadap beberapa jenis antibiotik antara lain *Sulfamid*, *Chloramphenicol*, *Kamamycin* dan *Penicillin* (Tortora *et al.*,1989).

3. METODOLOGI

3.1 Bahan dan Alat

3.1.1 Bahan

Bahan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Nutrien Broth (NB), bactoagar, garam fisiologis, biakan bakteri *Esherichia coli*, NaCl, aquades, Nutrien Agar (NA), isolat khitosan, NaOH, HCl, H₂O₂, asam asetat 2 % dan alkohol.

3.1.2 Alat

Sedangkan alat-alat yang digunakan adalah autoclaf, Clean bench, inkubator, oven, cawan petri, tabung Erlenmeyer, tabung reaksi, labu pengencer, pipet, gelas piala, counter digital dan Bunsen.

3.2 Prosedur kerja

Penelitian dilakukan dalam dua bagian yaitu pertama pembuatan khitosan dan yang kedua aplikasi khitosan sebagai zat antibakteri dengan *Total Plate Count* (TPC).

3.2.1 Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan dilakukan untuk mengetahui konsentrasi yang tepat digunakan dalam penghambatan pertumbuhan bakteri dan mencari kepadatan jumlah koloni bakteri. Konsentrasi khitosan yang digunakan adalah 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm dan 400 ppm dengan pengenceran 10^{-6} dan 10^{-7} .

3.2.2 Pembuatan Khitosan (Suptijah *et al.*, 1992)

Cara yang dilakukan adalah mempersiapkan bahan baku, dicuci, dikeringkan dan dihancurkan dengan blender. Dilakukan proses Demineralisasi yaitu dengan penambahan HCl 1 N dengan perbandingan bobot bahan dan volume pengestrak sebanyak 1 : 7 (b/v) selama satu jam

pada suhu 90 °C kemudian dilakukan pencucian sampai bahan dalam kondisi netral. Deproteinase dilakukan dengan menambahkan NaOH 3,5 N perbandingan 1 : 10 selama satu jam dengan suhu 90 °C kemudian dilakukan pencucian. Deasetilasi dilakukan dengan menambahkan NaOH 50 % perbandingan 1 : 4 selama satu jam suhu 140 °C. Dilakukan pencucian, pengeringan dan terbentuklah khitosan.

3.2.3 Pembuatan Larutan Khitosan

Khitosan ditimbang sebanyak satu gram kemudian dilarutkan dalam 2 ml asam asetat dan ditambah dengan aquades sampai 1000 ml hingga membentuk larutan tersuspensi. Dibuat larutan baku sebanyak 1000 ppm kemudian diencerkan dengan aquades menjadi 150 ppm, 175 ppm, 200 ppm dan 250 ppm.

3.2.4 Analisis

Analisis yang digunakan adalah analisis proksimat mutu khitosan untuk menentukan kadar air, kadar abu, dan protein yang dikandung khitosan, analisis derajat deasetilasi dan viskositas serta analisis bakteri dengan menggunakan metode TPC.

3.2.4.1 Kadar Air (Sulaeman *et. al.* ,1995)

Kadar air ditentukan dengan menggunakan oven pada suhu 105 °C. satu setengah gram bahan dikeringkan dalam oven sampai beratnya tetap (konstan). Kadar air dapat dihitung dengan rumus dibawah ini :

$$\% \text{ KadarAir} = \frac{a-b}{c} \times 100\%$$

dimana :

a = Berat wadah dan bahan mula-mula (gram)

b = Berat wadah dan bahan setelah dikeringkan (gram)

c = Berat bahan (gram)

3.2.4.2 Kadar Abu (Suleaman *et al*, 1995)

Bahan seberat satu setengah gram diabukan dalam tanur dengan menggunakan dua tahan pengabuan pada suhu 450 °C, kemudian dinaikkan suhunya hingga mencapai 550 °C selama 2 - 3 jam. Kadar abu dapat dihitung dengan menggunakan:

$$\% \text{ Kadar Abu} = \frac{\text{Berat Abu(gram)}}{\text{Berat Sampel}} \times 100\%$$

3.2.4.3 Total Nitrogen (Fitrial, Y. 1996)

Langkah pengukuran nitrogen dimulai dengan menimbang sampel sebanyak 5 gram. Kemudian dimasukkan dalam tabung Kjeltex dan ditambahkan satu tablet Kjeltex dan 10 ml asam sulfat pekat selanjutnya bahan didestruksi pada suhu 430 °C sampai warna sampel menjadi bening. Selain tahap destruksi dilanjutkan dengan tahap destilasi. Proses destilasi dilakukan dengan menggunakan Kjeltex System. Hasil dari proses destilasi selanjutnya dititrasi menggunakan HCl 1 %. Kadar Nitrogen dapat dihitung dengan persamaan sebagai berikut :

$$\% \text{ Nitrogen} = \frac{(14.01 \times A - B) \times C}{D \times 10} \times 100 \%$$

dimana :

A = ml titrasi sampel

B = ml titrasi blanko

C = molaritas asam standar

D = gram sampel

3.2.4.4 Derajat deasetilasi (Suptijah *et al.*, 1995)

Spektrum Infra merah dapat dibuat dengan menggunakan Spektrofotometer Infra merah IR - 408. Frekwensi yang digunakan antara 4000 cm^{-1} sampai dengan 400 cm^{-1} . Derajat deasetilasi bahan ditentukan dengan metode "base line" yang ditemukan oleh Moore dan Robert. Dua gram digerus dalam mortal dalam bentuk serbuk KBr. Kemudian dicetak dengan cetakan pelet . Pelet tipis yang transparan diteliti dengan Infra merah sehingga diperoleh kromatogram IR. Puncak tertinggi (Po) dan puncak terendah (P) dicatat dan diukur dari garis yang dipilih. Nilai Absorbansi dihitung dengan menggunakan rumus :

$$A = \text{Log } P_o/P$$

Perbandingan antara absorbansi pada 1665 cm^{-1} dengan absorbansi 3450 cm^{-1} digandakan dengan satu per standar N - deasetilasi khitosan Dengan mengukur nilai absorbansi pada puncak yang berhubungan nilai persen N - asetilasi dapat dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ N-Deasetilasi} = \left[1 - \left(\frac{A_{1654}}{A_{3450}} \times \frac{1}{1,33} \right) \right] \times 100 \%$$

3.2.4.5 Viskositas (Sophanodora dan Benjakula, 1993)

Khitosan sebanyak dua gram dilarutkan dengan 200 ml asam asetat 2 % selanjutnya dilakukan pengukuran nilai viskositas menggunakan viskosimeter rotari model BM. Rotari yang digunakan saat pengukuran viskositas adalah rotari no. 2 dengan menggunakan kecepatan putaran 60 rpm. Nilai viskositas dapat dihitung menggunakan rumus :

$$\text{Viskositas (cps)} = \text{Nilai terukur} \times (\text{konstanta R-2, v 60 rpm})$$

3.2.5 Pengujian Antibakteri Berdasarkan Jumlah TPC Yang Tumbuh.

3.2.5.1 Persiapan Alat

Alat disterilisasi dengan menggunakan autoclaf 121 °C selama 5 menit. Peralatan dan bahan yang disterilkan harus dilindungi dengan cara membungkus, menyumbat atau menaruhnya dalam suatu wadah tertutup.

Medium biakan disterilisasi dengan menggunakan autoclaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Peralatan gelas yang sudah disterilkan sebelum digunakan didinginkan sampai mencapai suhu ruang.

3.2.5.2 Pembuatan Media dan Perhitungan Kultur Bakteri

Pembuatan media NA dilakukan dengan cara melarutkan 23 gr NA dalam satu liter Aquades kemudian diaduk dan dipanaskan hingga homogen dan disterilkan dalam autoclaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Pembuatan media NB dilakukan dengan cara melarutkan 1,25 gr ditambah dengan aquades 50 ml NB diaduk dipanaskan hingga homogen kemudian disterilisasi. Cairan NB yang telah steril dimasukkan dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 10 ml secara aseptik.

Kultur bakteri sebanyak 2 ose dari hasil biakan murni Laboratorium Mikrobiologi Hasil Perikanan diinokulasi kedalam medium NB steril sebanyak 10 ml. Kultur bakteri diinkubasi dalam shakker dengan agitasi 70 rpm 24 jam pada suhu kamar.

3.2.5.2.1 Persiapan Pengenceran

Sebanyak 8 tabung dengan sumbat kapas yang telah steril disisipkan dan disusun berderet. Setiap tabung diberi label. Pada masing-masing tabung diisi dalam larutan pengencer yaitu garam fisiologis 9 ml.

3.2.5.2.2 Pengenceran

Kultur bakteri yang telah diinkubasi dalam NB dihomogenkan dengan cara mengocok sampai kekeruhannya merata. Secara aseptik 1 ml sampel diambil dan dipipet dan dimasukkan dalam tabung ke-1 yang berisi 9 ml

larutan garam fisiologis sebagai blanko pengenceran 1:10. Pipet yang telah dipakai diletakkan dalam wadah yang berisi desinfektan. Setelah tabung satu yang berisi biakan bakteri dikocok. Secara aseptik diambil 1 ml sampel dari tabung satu dipipet dan dimasukkan dalam tabung kedua yang berisi 9 ml larutan fisiologis sebagai blanko pengencer dan disebut pengenceran $1:10^2$, demikian seterusnya sampai pada pengenceran $1:10^7$.

3.2.5.2.3 Penuangan

Pada masing masing pengenceran 10^{-6} dan 10^{-7} yang merupakan hasil pengenceran diambil sebanyak 1 ml dengan pipet steril. Media NA steril dalam erlemeyer diambil dalam penangas air bersuhu 50°C . Secara aseptik NA cair dituang dalam cawan petri dan kemudian dimasukkan juga konsentrasi khitosan sebanyak 1 ml dan biakan bakteri *Escherichia coli* sebanyak 1 ml. Cawan petri tersebut digoyang perlahan-lahan hingga tercampur merata dan sampai membeku, kemudian dibalik. Konsentrasi khitosan yang digunakan yaitu 150 ppm, 175 ppm, 200 ppm dan 250 ppm.

3.2.5.2.4 Inkubasi

Setelah inokulum menyebar rata dan agar NA padat cawan petri tersebut diletakkan terbalik dalam inkubator pada suhu $35-37^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam.

3.2.5.2.5 Perhitungan Jumlah koloni Bakteri

Setelah diinkubasi selama 24 jam cawan petri dikeluarkan dari inkubator, kemudian dihitung jumlah koloni yang tumbuh. Dan pilih jumlah koloni yang mengandung koloni berjumlah 30-300.

$$\text{Jumlah Organisme per ml biakan} = \frac{\text{Jumlah koloni bakteri yang terhitung}}{\text{Faktor pengeceran}}$$

3.2.6 Metode Penelitian

Metode penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) searah. Sebagai perlakuan adalah konsentrasi khitosan (0 ppm, Asam asetat, 150 ppm, 175 ppm, 200 ppm, 250 ppm) dan sebagai ulangan adalah hari (1 dan 3).

Model dugaan yang digunakan dalam metode ini adalah :

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_j$$

Y_{ij} = Data perlakuan ke-i, ulangan ke-j

μ = Rataan umum populasi

T_i = Pengaruh perlakuan ke-i

ε_j = Sisaan pada perlakuan ke-i, ulangan ke-j



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pembuatan Khitosan

Pembuatan khitosan dilakukan untuk mendapatkan produk khitosan yang baik sehingga diharapkan dapat digunakan sebagai zat antibakteri dengan baik juga. Proses pembuatan Khitosan terdiri dari beberapa tahap, yaitu persiapan bahan, isolasi khitin dan isolasi khitosan. Pada persiapan bahan dilakukan pencucian, pengeringan dan penggilingan sehingga dihasilkan limbah udang kering yang bersih dari kotoran yang melekat, berukuran sesuai dengan standar khitosan yaitu antara 1,77-3,25 mm (Suptijah *et al.*, 1995). Limbah udang yang sudah siap untuk proses mengandung khitin dalam keadaan yang tidak murni, tetapi bergabung dengan unsur-unsur lain seperti protein, unsur mineral dan berbagai macam pigmen. Oleh sebab itu untuk mendapatkan khitin dalam keadaan murni perlu dilakukan deproteinasi dan demineralisasi dengan perlakuan sesuai dengan karakter asosiasi khitin dengan protein dan mineral.

Proses pengisolasian khitin ada dua cara yaitu pertama dengan proses demineralisasi kemudian dilanjutkan dengan proses deproteinasi. Dan yang kedua deproteinasi dilakukan terlebih dahulu kemudian dilanjutkan dengan demineralisasi. Bila deproteinasi dilakukan terlebih dahulu maka protein dapat diikat oleh NaOH menjadi Na-proteinat. Selanjutnya protein tersebut dipisahkan kembali menjadi endapan natrium dan protein dapat digunakan untuk suplemen. Dalam penelitian ini, metode pengisolasian khitin yang digunakan adalah cara pertama.

Demineralisasi terhadap limbah udang dapat dilakukan dengan berbagai metode. Knorr (1982) melakukan demineralisasi menggunakan larutan HCl 1,25 N, perbandingan bahan 1 : 12 b/v dan diisolasi selama 30 menit. Bastaman (1989) menggunakan larutan HCl 1,25 N, perbandingan bahan 1 : 10 b/v dan diisolasi selama satu jam pada suhu 70 – 75 °C. Sedangkan cara demineralisasi yang digunakan pada penelitian ini adalah

metode yang dilakukan Suptijah *et al.* (1992) yaitu menggunakan larutan HCl 1 N, nisbah 1 : 7 b/v selama satu jam pada suhu 70 °C. Supaya proses demineralisasi dapat berlangsung sempurna, diusahakan agar konsentrasi asam yang digunakan serendah mungkin dan disertai pengadukan yang konstan. Pengadukan yang konstan menyebabkan asam konsentrasi rendah yang bereaksi sempurna dengan bahan baku yang digunakan.

Deproteinasi dapat menurunkan kadar protein dari limbah udang. Sama halnya seperti demineralisasi, metode deproteinasi yang dapat dilakukan cukup banyak. Hong *et al.* (1989) melakukan proses deproteinasi menggunakan larutan NaOH 3,5 N, perbandingan bahan 1 : 10 b/v selama 30 menit. Bastaman (1989) menggunakan larutan NaOH atau KOH 3,5 N, nisbah bahan 1 : 6 b/v yang dipanaskan pada suhu 80 - 85 °C selama 30 menit. Sedangkan Suptijah *et al.* (1992) menggunakan larutan NaOH 3,5 %, nisbah bahan 1 : 10 b/v yang dipanaskan pada suhu 90 °C selama satu jam dan metode terakhir ini yang digunakan dalam penelitian .

Setelah dilakukan demineralisasi dan deproteinasi, dihasilkan produk yang dinamakan khitin yang berwarna merah muda atau pink. Warna ini merupakan pigmen karetenoid astaxanthin yang terdapat dalam limbah udang. Agar produk terlihat menarik maka khitin perlu diputihkan. Pemutih yang digunakan dalam penelitian ini adalah larutan Hidrogen peroksida (H₂O₂) 1%. Khitin direndam selama 6 - 7 jam pada suhu kamar dan tidak dilakukan pencucian sehingga terjadi proses oksidasi yang mampu menghilangkan pigmen. Pemutih lainnya yang dapat digunakan adalah Natrium hipoklorit (NaOCl) 0,315 % dengan perbandingan antara khitin dan larutan NaOCl sebesar 1 : 10 b/v selama 30 menit pada suhu kamar (Suptijah *et.al*, 1992). Rendeman khitin yang diperoleh dari limbah udang dalam penelitian ini sebesar 25 %. Hasil sesuai dengan penelitian Suptijah *et. al.*, (1992) dan penelitian Johnson dan Peniston (1982) yang keduanya menunjukkan bahwa kandungan khitin yang diperoleh dari limbah udang berkisar antara 20 - 30 %. Hal ini juga menunjukkan bahwa proses

isolatsi khitin berjalan dengan baik dan reaksinya hampir sempurna sehingga banyak mineral dan protein yang dapat dihilangkan.

Khitosan yang dihasilkan pada akhir penelitian diperoleh pada proses deasetilasi terhadap khitin yang menggunakan larutan NaOH 50 %, nisbah bahan 1 : 20 b/v, selama satu jam pada suhu 140 °C (Suptijah *et al.*,1992). Konsentrasi NaOH dan suhu yang digunakan sesuai dengan penelitian Muzzarelli (1977) yang menyatakan bahwa khitin mempunyai struktur kristal yang panjang dengan ikatan yang kuat antara atom nitrogen dengan gugus karboksil. Oleh karena itu pada proses deasetilasi digunakan larutan natrium hidroksida berkonsentrasi tinggi (lebih besar dari 40 %) dan suhu tinggi 100°C-150 °C.

4.2 Analisis Khitosan

Adapun produk akhir pembuatan khitosan setelah analisis proksimat meliputi kadar air, kadar abu, kadar total nitrogen; derajat deasetilasi, dan viskositas dapat dilihat pada Tabel 3 sebagai berikut :

Tabel 3. Hasil dan analisis proksimat, derajat deasetilasi, dan viskositas Khitosan.

Parameter	Nilai
Ukuran partikel	Serpihan
Kadar air (%)	8,67
Kadar abu (%)	0,11
Kadar total nitrogen (%)	4,93
Derajat deasetilasi (%)	81,51
Viskositas (cps)	14.000,00

Ukuran partikel merupakan faktor yang sangat mempengaruhi tingkat kelarutan suatu bahan semakin khitosan berbentuk serbuk maka larutan khitosan akan mudah menjadi larut. Kelarutan akan mempengaruhi kesempurnaan larutan khitosan yang akan digunakan sebagai zat uji

aktivitas. Ukuran partikel yang terbentuk dalam pembuatan khitosan ini adalah serpihan dan bentuk ini masih dapat digunakan karena karakteristik khitosan yang baik atau masih dapat digunakan adalah bentuk serpihan sampai serbuk yaitu berukuran sesuai dengan standar untuk khitosan yaitu antara 1,77 – 3,25 mm sehingga hal ini telah sesuai dengan standar yang ditentukan oleh Laboratorium Protan dalam Suptijah *et al.* (1992).

Berdasarkan analisis proksimat yang disajikan pada tabel diketahui bahwa kadar air khitosan adalah 8,67 persen. Standar kadar air khitosan untuk komersil maksimum 10 persen, sehingga kadar air khitosan yang dianalisis telah memenuhi standar mutu yang telah dikeluarkan oleh laboratorium Protan dalam Suptijah *et al.* (1992). Kadar air merupakan parameter yang penting dalam menentukan mutu Khitosan. Kadar air ditentukan oleh kemampuan bahan itu sendiri dalam menyerap air dan kondisi pengeringan sebelum penyimpanan. Khitosan diketahui mempunyai kemampuan untuk menyerap air lebih tinggi dibanding khitin (Suptijah *et al.*, 1992). Disamping itu kadar Khitosan tergantung pada kelembaban relatif udara sekeliling tempat penyimpanan karena khitosan bersifat higroskopis. Karena itu untuk usaha komersial, pengemasan produk perlu mendapat perhatian khusus agar mutu produk terjamin.

Untuk kadar abu didapatkan sebesar 0,11 persen. Standar mutu yang dihasilkan telah memenuhi standar yang telah ditentukan oleh laboratorium Protan dalam Suptijah *et al.* (1992) yaitu sebesar 2 persen. Kadar abu merupakan parameter yang penting dalam menentukan keefektifan proses demineralisasi. Abu merupakan sisa yang tertinggal setelah proses pembakaran sampai bebas karbon (Supriyatna, 1981). Sisa yang tertinggal ini sebenarnya merupakan unsur-unsur mineral yang terdapat dalam suatu bahan. Pada proses pengabuan, unsur-unsur tersebut membentuk oksida-oksida yang bergabung dengan radikal negatif seperti sulfat, fosfat, nitrat atau klorida. Sedangkan bahan organik yang lain dalam proses ini akan terbakar. Secara umum kulit udang mengandung 30 - 50 % mineral dan

mineral terbesar pada kulit udang adalah garam CaCO_3 dan Ca Sulfat. Kalsium karbonat ini lebih mudah dipisahkan dibandingkan protein yang karena garam anorganik dapat dihilangkan dengan melarutkan bahan pada asam, dalam penelitian ini digunakan asam klorida dan prosesnya dinamakan demineralisasi.

Menurut Hong *et al.* (1989), kadar total nitrogen yang tersisa dalam proses deproteinasi dapat dijadikan sebagai parameter efektivitas proses deproteinasi. Kadar total nitrogen hasil penelitian adalah sebesar 4,39 %. Metode Kjeldahl yang digunakan dalam analisis protein ini adalah untuk menghitung kadar nitrogen total, baik nitrogen dari protein maupun dari khitosan yang mengandung gugus amina. Sehingga demikian diperoleh hasil yang tinggi yang merupakan kandungan nitrogen khitosan dari protein yang tersisa. Cara yang bisa digunakan untuk mengurangi kadar nitrogen dari khitosan adalah dengan melakukan proses deproteinasi sebanyak dua kali. Adanya perbedaan antara jumlah protein total dan jumlah protein yang terikat secara kovalen menyebabkan tidak ada proses deproteinasi optimum sama untuk setiap jenis udang.

Berdasarkan hasil analisis diketahui bahwa viskositas khitosan besarnya 14.000,00 cps. Nilai ini standar yang dikeluarkan oleh laboratorium protan dalam Suptijah *et al.*, (1992) termasuk dalam khitosan tingkat tinggi karena nilainya lebih dari 2000 cps. Tingginya nilai viskositas ini dipengaruhi oleh deasetilasi yang hampir sempurna dimana waktu deasetilasi dan konsentrasi yang digunakan sudah tepat. Derajat deasetilasi hasil analisis sebesar 81,51 persen. Dengan nilai sebesar ini berarti khitosan yang dihasilkan telah memenuhi standar yang telah ditentukan oleh laboratorium protan dalam Suptijah *et al.* (1992) karena nilainya lebih dari 20 %. Hasil menunjukkan bahwa proses deasetilasi telah berjalan dengan baik. Lamanya proses deasetilasi dan tingginya konsentrasi NaOH akan mengakibatkan penurunan berat molekul dan viskositas khitosan. Pada kondisi deasetilasi, khitosan memiliki panjang rantai yang lebih pendek

dibanding khitin. Oleh karena itu, bila khitosan itu dilarutkan dalam kondisi asam, viskositas beragam dan berhubungan langsung dengan bobot molekul dan derajat deasetilasi. Peningkatan konsentrasi NaOH menyebabkan penurunan viskositas. Hal ini disebabkan karena menurunnya berat molekul akibat adanya pemecahan ikatan polimer (depolymerisasi) rantai molekul khitosan. Selain waktu deasetilasi dan konsentrasi NaOH. Bastaman (1989) menyatakan bahwa panas dapat menyebabkan suatu polimer mengalami depolymerisasi, selanjutnya depolymerisasi dapat menyebabkan terjadinya pemecahan rantai molekul polimer sehingga berat molekul dan viskositas larutan polimer menurun sejalan meningkatnya suhu.

Derajat deasetilasi adalah penghilangan gugus asetil yang terdapat pada khitin. Khitin yang telah mengalami proses deasetilasi disebut khitosan. Secara alami khitin sudah mengalami proses deasetilasi dengan deasetilasi lebih kecil dari 36,45 % (Bastaman, 1989). Khitin yang diasetilasi akan menjadi khitosan yang mempunyai sifat larut asam dalam apabila derajat deasetilasinya lebih dari 70 %. Derajat deasetilasi yang tinggi menunjukkan kemurnian dari khitosan yang dihasilkan. Oleh karena itu, kondisi yang dipilih pada proses deasetilasi ini adalah yang memberikan nilai derajat deasetilasi yang maksimum dengan mempertimbangkan faktor konsentrasi alkali dan waktu pemanasan. Pernyataan ini didukung oleh Johnson dan Peniston (1982) yang menyatakan bahwa perlakuan alkali akan berpengaruh secara langsung terhadap pemecahan polimer dari rantai molekul khitosan. Semakin tinggi konsentrasi alkali yang digunakan untuk proses deasetilasi semakin tinggi, tetapi terjadi penurunan berat molekul karena terjadi pemecahan rantai molekul khitosan. Derajat deasetilasi dari khitosan diukur dengan menggunakan spektrofotometer infra merah IR - 408 adalah sebesar 81,51 %. Dengan nilai sebesar ini berarti khitosan yang dihasilkan telah memenuhi standar mutu komersial yang telah ditentukan oleh Laboratorium Protan Laboratories karena nilainya lebih dari 70 %.

4.3 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri

4.3.1 Penelitian Pendahuluan

Metode hitungan cawan didasarkan pada anggapan bahwa setiap sel yang dapat hidup akan berkembang menjadi satu koloni yang muncul pada cawan yang merupakan suatu indeks pada jumlah bakteri organisme yang dapat hidup yang terkandung dalam sampel. Peningkatan jumlah bakteri yang cukup tinggi dipengaruhi oleh beberapa faktor. Faktor-faktor yang mempengaruhi jumlah bakteri ada dua faktor. Faktor pertama adalah faktor intrinsik meliputi pH, aw, kandungan nutrisi, senyawa antimikrobia. Faktor ekstrinsik antara lain suhu, dan kelembaban relatif. Bakteri dihitung langsung dengan Counter Digital penghitung bakteri. Dari hasil penelitian pendahuluan didapatkan bahwa pada konsentrasi 100 ppm sebesar TBUD, konsentrasi 200 ppm sebesar $5,2 \times 10^7$ koloni/ml, konsentrasi 300 ppm sebesar 3×10^6 koloni/ml dan konsentrasi 400 ppm tidak ada koloni. Dari hasil penelitian pendahuluan diambil konsentrasi perlakuan 0 ppm, as. asetat 2% 150 ppm, 175 ppm, 200 ppm dan 250 ppm sebagai penelitian utama.

4.3.2 Penelitian Utama

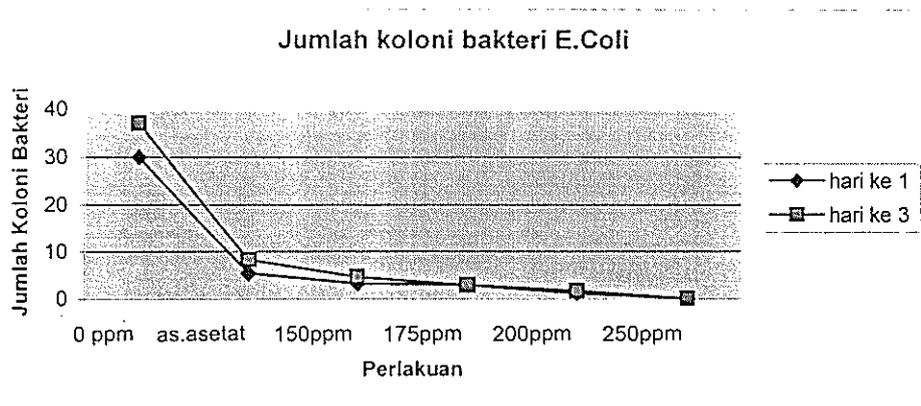
Dari pengamatan jumlah koloni bakteri didapatkan hasil seperti pada Tabel 4.

Tabel 3. Jumlah koloni bakteri *E. coli*

Hari	Perlakuan (ppm)					
	Tanpa perlakuan	As. Asetat	150 ppm	175 ppm	200 ppm	250 ppm
1	3.0×10^8	5.4×10^7	3.3×10^7	2.9×10^7	1.1×10^7	0
3	3.6×10^8	8.3×10^7	4.7×10^7	2.9×10^7	1.7×10^7	0

Berdasarkan uji statistik dengan menggunakan rancangan acak lengkap searah menunjukkan bahwa dari analisis ragam didapatkan Fhit.

lebih besar dari F_{tab}. yaitu 6.3902 berbanding 4.3874 sehingga minimal ada satu perlakuan konsentrasi khitosan yang mempengaruhi pertumbuhan koloni bakteri *E. Coli*. Untuk uji lanjut dengan menggunakan uji Tukey (BNJ) dengan selang kepercayaan 95 % menunjukkan bahwa pada perlakuan 0 ppm dan asam asetat; 0 ppm dan 150 ppm; 0 ppm dan 175 ppm; 0 ppm dan 200 ppm ; 0 ppm dan 250 ppm; Asam asetat dan 175 ppm; 175 ppm dan 200 ppm; 175 ppm dan 250 ppm berbeda nyata. Di bawah ini disajikan grafik hubungan antara konsentrasi larutan khitosan terhadap jumlah koloni bakteri *Escherichia coli*.



Gambar 4. Hubungan antara konsentrasi perlakuan Khitosan terhadap jumlah koloni bakteri *E. coli*

Dari hasil uji larutan khitosan pada perlakuan 150 ppm, 175 ppm, 200 ppm, 250 ppm didapatkan hasil sebesar 3.3×10^7 koloni /ml, 2.9×10^7 koloni/ml, 1.1×10^7 koloni/ml, dan tidak ada koloni. Jika dibandingkan dengan kontrol yang menggunakan asam asetat dan tanpa perlakuan yaitu diperoleh jumlah 3.0×10^8 koloni/ml dan 5.4×10^7 koloni/ml berarti terjadi penurunan secara drastis terutama pada kontrol tanpa perlakuan larutan khitosan. Hal ini disebabkan oleh karena larutan khitosan yang dicampur dengan asam asetat 2 % dari khitosan berbentuk serbuk berfungsi sebagai zat antibakteri yang bersifat bakteriostatik sampai pada perlakuan 200 ppm. Hal ini terbukti karena masih ada koloni bakteri *E.Coli* yang tumbuh. Efek hambatan

pertumbuhan bakteri *E. Coli* karena adanya proses deasetilasi yang baik yaitu 81,51 %. Semakin banyak gugus asetil yang hilang maka akan semakin kuat juga ikatan gugus aminonya. Gugus amino (NH_2) dalam keadaan asam akan menjadi polimer kationik dengan struktur linier. Gugus NH_2 yang bersifat kationik ini mampu mengikat bakteri sehingga metabolisme bakteri terhambat dan berangsur-angsur bakteri tidak dapat tumbuh lagi. Mekanisme kerja dari larutan khitosan yang bersifat bakteristatik diduga hanya menghambat metabolisme kerja sel bakteri sehingga dapat menghambat pertumbuhannya. Tetapi sifat bakteristatik ini hanya dapat berubah jadi memberikan efek bakterisidal apabila konsentrasi larutan khitosan yang diberikan atau digunakan semakin tinggi. Mekanisme yang bersifat bakterisidal ini meliputi merusak dinding selnya sehingga pecah, dengan demikian bakteri tidak dapat bertahan terhadap pengaruh luar, dengan mengganggu keutuhan membran sel bakteri sehingga pertukaran zat aktif atau metabolit ke dalam dan keluar sel akan terganggu (Pelczar dan Chan, 1988). Efek bakterisidal yang disebabkan oleh lisis yaitu dengan penghambatan sintesis dinding sel yang lebih lanjut, dengan berbagai cara termasuk batas biakan yang tumbuh secara eksponensial, dengan antibiotik dinding sel atau penghilangan beberapa nutrisi apapun yang digunakan untuk sintesis peptidoglikan sehingga terjadi lisis. Efek bakterisidal ini dipengaruhi suhu, pH, konsentrasi jumlah mikroba dan spesies. Bakteri gram negatif (koliform) pada umumnya lebih mudah diserang oleh H_2O_2 dibanding bakteri gram positif pembentuk spora. Efek bakterisidal tidak hanya dipengaruhi oleh efek pada sel-sel bakteri tetapi juga karena terjadinya destruksi struktur molekul dasar asam nukleat dan protein sel.

Sedangkan mekanisme asam asetat dalam mempengaruhi aktivitas bakteri adalah, asam asetat memiliki gugus negatif COO^- dengan cara berikatan dengan ribosom, dapat menyebabkan terganggunya proses pembacaan kode pada mRNA, sehingga dapat menghambat proses sintesis protein. Pada uji aktivitas antibakteri pada hari ketiga didapatkan hasil yaitu

sebesar 3.6×10^8 koloni/ml, 8.3×10^7 koloni/ml, 4.7×10^7 koloni/ml, 2.9×10^7 koloni/ml, 1.7×10^7 koloni/ml pada konsentrasi perlakuan 0 ppm (tanpa perlakuan), asam asetat, 150 ppm, 175 ppm, 200 ppm. Hasil ini menunjukkan bahwa setelah hari ketiga, larutan khitosan efektif menghambat pertumbuhan bakteri, seperti pada data yang ditunjukkan diatas. Dari perlakuan 150 ppm, 175 ppm dan 200 ppm bakteri bersifat bakteriostatik karena bakteri masih dapat tumbuh pada ketiga perlakuan ini. Sedangkan untuk perlakuan 250 ppm tidak ada satupun bakteri yang tumbuh berarti pada konsentrasi tersebut khitosan bersifat bakterisidal.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Isolat khitin dan khitosan di beberapa negara maju telah dimanfaatkan sebagai alternatif peningkatan nilai tambah dari limbah udang selain karena tuntutan untuk mengatasi masalah lingkungan yang ditimbulkan oleh industri-industri pengolahan udang. Limbah padat udang mudah sekali mengalami kebusukan sehingga akan menimbulkan polusi udara terhadap lingkungan bila tidak segera ditangani. Selain itu juga bersifat menyita ruang sehingga membutuhkan tempat yang cukup luas dan tertutup untuk penampungannya. Aplikasi khitin dan khitosan sangat luas baik di bidang pertanian, pangan, bioteknologi, kesehatan, dan kosmetik. Khitosan juga telah dimanfaatkan sebagai bahan anti jamur pada penyimpanan ikan jambal.

Proses pengolahan limbah udang menjadi khitosan dilakukan dengan beberapa tahap yaitu proses demineralisasi, deproteinasi, dan deasetilasi. Pada pembuatan khitosan didapatkan hasil analisis yaitu ukuran partikel berupa serbuk, kadar air sebesar 8,67 %, kadar abu sebesar 0,11 %, kadar total nitrogen sebesar 4,39 %, derajat deasetilasi 81,51 % dan viskositas 14.000,00 cps. Dari semua hasil analisis hasil penelitian hampir semua parameter dikatakan telah memenuhi standar komersial yang telah ditetapkan oleh Laboratorium Protan dalam Suptijah *et al.*, (1992) dan semua proses pembuatan khitosan telah berjalan dengan baik.

Hasil isolasi khitosan dalam aplikasinya sebagai zat antibakteri, menggunakan metode *Total plate count* (TPC) pada biakan bakteri *E. Coli* dengan pengenceran 10^{-6} dan 10^{-7} serta konsentrasi perlakuan 150 ppm, 175 ppm, 200 ppm dan 250 ppm. Pada perlakuan 150 ppm, 175 ppm dan 200 ppm zat uji antibakteri berupa larutan khitosan, ternyata dapat menghambat pertumbuhan jumlah koloni bakteri jadi bersifat bakteristatik dengan koloni bakteri masih dapat tumbuh pada selang waktu berikutnya tapi masih dalam batas toleransi. Sedangkan pada perlakuan 250 ppm

menunjukkan bakterisidal yaitu dengan tidak adanya koloni bakteri yang tumbuh pada perlakuan ini.

Dari analisis ragam didapatkan Fhit lebih besar daripada F tab. berarti bahwa minimal ada satu perlakuan khitosan yang mempengaruhi pertumbuhan koloni bakteri *Escherichia coli*.

5.2 Saran

Dari hasil uji selama penelitian yang dilakukan disarankan agar konsentrasi khitosan yang digunakan lebih rendah. Biakan bakteri yang digunakan sebaiknya bervariasi terutama bakteri yang merugikan bagi kehidupan kita terutama bakteri penyebab kebusukan makanan sehingga dapat dicegah dan dihambat.

DAFTAR PUSTAKA

- Arlius. 1991. Mempelajari Ekstrak Khitosan dari Kulit Udang dan Pemanfaatannya Sebagai Bahan Koagulan Protein Limbah Pengolahan Pindang. Program Pasca Sarjana. IPB. Bogor.
- Bastaman, S. 1989. Studies on Degradation and Ekstraction of Chitin and Chitosan From Prawn Shells. The Departement of Mechanical Manufacturing. The Quenn's University of Belfast.
- Bough, W.A. 1975. *Coagulation With Chitosan aid to recovery of by-product from egg breaking waste*. Poultry Sci. 54: 1904-1911.
- Brock, H.C. dan M. J. Madigan. 1994. Biology of Mikrorganisme. Prentice Hall International.
- Brzeski, M. M. 1987. Chitin and Chitosan Pathing Waste to Good Use. Info Fish. Number 5/87
- Chandrkrachang, S., U. Chinadit, P. Chandayot and T. Supasiri. 1991. *Profitable spin- offs from shrimp- seaweed polyculture*. Infofish 6/90.
- Ditjen Perikanan, 1999. Statistik Perikanan Indonesia. Departemen Perikanan Direktorat Jendral Perikanan. Jakarta.
- Fitrial, Yusphihina. 1996. Penuntun Praktikum Biokimia Hasil Perikanan . LPM. IPB. Bogor.
- Fardiaz, S. 1992. Mikrobiologi Pangan I. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta
- Ghought, A. W., J. Arul, J Grenire, and A. Aselin. 1992. Antifungal Activity of Chitosan on Two Postharvest Phatogens of Strawberry Fruit. Phytopathology 82; 398-402.
- Hadi, W. dan J. Supriana. 1984. Pengembangan Udang Galah dalam Hachery dan Budidaya. Kanasius. Yokyakarta.
- Hirano, S. 1989. Production and aplication of chitin and chitosan in Japan. In *Chitin and Chitosan, Sources Chemistry Biochemistry Phisical Properties and Aplication*. Elsevier Science Published Ltd. England. 56-58 p.

- 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.
- Hong, H. N., K. Meyers, S. P dan Lee, K S. 1989. Isolation and Characterization Of Chitin From Crawfish Shell Waste. *J. Agric. Food Chem.* 37: 375-579 p.
- Ilyas. S. 1983. *Teknologi Refrigerasi Hasil Perikanan*. Jilid I. Cv. paripurna. Jakarta. 237 p.
- Jhonson, E.L dan Q. P. Peniston, 1982. Utilization of Shellfish Waste for Production of Chitin and Chitosan production. *Dalam Chemistry and Biochemistry of Marine Food Product*. Editor P. Sandford, A. Thorllef dan gudmund Sk jak-Break. The AVI Publising Company Inc. West Ford. Connecticut.
- Knorr, D. 1984. The Use of Chitinous Polimers in Food. *J. Food tech* 85-94.
- Knorr, D. 1986. Dye Binding Properties Chitin and Chitosan. *Food Sci.* New York.
- Metting, B. dan J.W. Pyne. 1986. Biologically active Coumpunds From Microalgae *Enzym Microb Technol.* Vol. 8, Juli Butterwort and Co. Pub.
- Muzzarelli, R.A.A. 1977. *Chitin*. Pergamon Press, Oxford.
- Ornum, J. 1992. Shrimp Waste Must It Be Waste? *Info Fish* 6/9 48-51 p.
- Papineau, A. M., D. G. Hoover, D. Knorr, and D. F Farkas, 1991. Antimicrobial effect of Water soluble chitosan with high Hidrostatic Pressure. *Food Biotechnol.* 5 : 45-57.
- Pelczar, M. J. dan E.C. S. Chan. 1988. *Dasar-dasar Microbiologi*. Jilid 1 dan 2. Hadioetomo, R.S.,T Imas. Tjitrosomo, dan S.L Angka (Penterjemahan). UI Press. Jakarta.
- Rha, C. 1984. Chitosan as Biomaterial. *Dalam Biotechnology in the Marine Sience*. Editor. R Collwell, A. J. Sinsley dan E.R. Periser. Jhon Willey and Sons. New York.
- Salle, A.J. 1961. *Fundamental Principles of Bakteriologis*. Fifth Edition. MC. Graw-Book Company. Inc. New York.

- Sandford, P. A. dan G.P. Hutching . 1987. Chitosan dan Natural Kationik, biopolimer, commercial, application. Dalam *Industrial Pollysaccharides*. Editor Yalpani, M. Proceeding of the Symposium on the Application and modification of The Industrial Polysaccharides Elsevier Sci. Co. Inc: New York.
- Sanford, F.A., 1989. Chitin Comercial Uses and Potencial Aplications. Didalam *Chitin and Chitosan, Source*.
- Santoso, S. 1999. Isolasi Karakteristik dan Penentuan Konsentrasii Hambatan Minimum Senyawa Antibakteri dari Kumis Kucing (*Orthosiphon aristulus*). Skripsi. Jurusan Kimia. Fakultas FMIPA. IPB. Bogor.
- Seo H., K Mitsuhashi, and H. Tanibe. 1992. Antibacterial and Antifungal fiber Bended by Chitosan, p. 34-40. In C. J Brine, P.A. sandford, and J. P. zikakis (ed). *Advances in Chitin and Chitosan*. Elsevier Applied Science, New York.
- Sophanodora, P. dan S. Benjakula. 1993. Converion and Utilization of Chitosan from Prawn Shell. Dalam *Development of Food Science and Tecnology in Southeast Asia*, Prosiding at the 4th Asean Food conference.
- Sulaeman , A. F. Anwar, Rimbawan dan S. A Marliyati. 1995. Metode Analisa Zat Gizi dan Komposisi Kimia Lainnya dalam Makanan. Jurusan GMSK. Fakultas Pertanian . IPB.
- Supriyatna. 1988. Penuntun Praktikum Kimia Makanan. Akademi Kimia Analisis Bogor. 1-6 p.
- Suptijah, P, E. Salamah , H. Sumaryanto, S. Purwaningsih dan Santoso, J. 1992. Pengaruh Berbagai Metode Isolasi Khitin Udang terhadap Kadar dan Mutunya. Laporan akhir Penelitian. Fakultas Perikanan IPB.
- Tortora, G.J., B.R. Funcke, dan C.L Case. 1989. *Microbiolgy an Introduction*. Third Edition The Benjamin/Cumming Pulb. Co. Inc. California.
- Walker-Simmons, M., L. A. Hadwiger, and C. A Ryan. 1983. Chitosan and pectic polysaccharides both induce the accumulation of the antifungall phytoalexyn pisatin in pea pods and anti nutrient proteinase inhibitors in tomato leaves. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 110:194-199.

LAMPIRAN

Lampiran 1

Jumlah koloni bakteri E.Coli pada inkubasi hari ke-1 secara duplo

Perlakuan (ppm)	Pengenceran 10^{-6}		Pengenceran 10^{-7}	
Tanpa Perlakuan	1.42×10^8	1.33×10^8	5.1×10^8	4.7×10^8
	1.24×10^8		4.3×10^8	
As, Asetat	1.5×10^8	1.8×10^7	1.0×10^8	9×10^7
	2.1×10^7		8×10^7	
150 ppm	7×10^6	6×10^6	8×10^7	6×10^7
	5×10^6		8×10^7	
175 ppm	9×10^6	8×10^6	4×10^7	5×10^7
	7×10^6		6×10^7	
200 ppm	3×10^6	2×10^6	2×10^7	2×10^7
	1×10^6		2×10^7	
250 ppm	0	0	0	0

Lampiran 2

Jumlah koloni bakteri E.Coli pada inkubasi hari ke-3 secara duplo

Perlakuan (ppm)	Pengenceran 10^{-6}		Pengenceran 10^{-7}	
Tanpa Perlakuan	1.53×10^8	1.49×10^8	5.8×10^8	5.9×10^8
	1.45×10^8		6.0×10^8	
As. Asetat	1.8×10^7	2.6×10^7	1.5×10^7	1.4×10^8
	2.4×10^7		1.3×10^7	
150 ppm	1.5×10^7	1.4×10^7	9×10^7	8×10^7
	1.3×10^7		7×10^7	
175 ppm	7×10^6	9×10^6	4×10^7	5×10^7
	1.1×10^7		6×10^7	
200 ppm	5×10^6	4×10^6	4×10^7	3×10^7
	3×10^6		2×10^7	
250 ppm	0	0	0	0

LAMPIRAN 3

Contoh Perhitungan Organisme per ml biakan

Organisme per ml biakan = Jumlah Koloni yang terhitung

Faktor Pengenceran

$$= 152 / 10^{-6}$$

$$= 152 \times 10^6$$

$$= 1.52 \times 10^8$$

Lampiran 4.

Rancangan acak lengkap searah uji aktivitas antibakteri

Hari	Perlakuan					
	0 ppm	as.asetat 2%	150ppm	175ppm	200ppm	250ppm
1	30'	5	33	42	11	0
3	36	8	4	47	21	0

ANOVA

Sumber Keragaman	JK	db	KT	Fhit.	Ftab
Perlakuan	2731.6667	5	546.3333	6.9302 *	4.3874
Sisa	473	6	78.8333		
Total	2731.6667	11			

Fhit > Ftab.

* Minimal ada satu perlakuan khitosan yang memberikan pengaruh nyata terhadap pertumbuhan bakteri *E. Coli*

Uji Tukey (BNJ) dengan selang kepercayaan 95 %

$$\begin{aligned}
 W &= q \alpha (P, Fc) (KTS/r)^{0.5} \\
 &= 0.05 (6.6) (78.8333/2)^{0.5} \\
 &= 26.879
 \end{aligned}$$

Nilai tengah perlakuan setelah diurutkan :

175 ppm	0 ppm	150 ppm	200 ppm	as. asetat 2%	250 ppm
44.5	33	18.5	16.5	6.5	0

Kesimpulan : *

- * 0 ppm dan as. asetat 2%; 0 ppm dan 175 ppm ; 0 ppm dan 250 ppm ; as. asetat 2% dan 175 ppm; 175 ppm dan 200 ppm; 175 ppm dan 250 ppm berbeda nyata.
- * 0 ppm dan 150 ppm; 0ppm dan 200 ppm; as. asetat 2% dan 175 ppm; as. asetat 2% dan 200 ppm; as.asetat 2% dan 250 ppm; 150 ppm dan 175 ppm; 150 ppm dan 200 ppm; 150 ppm dan 250 ppm; 200 ppm dan 250 ppm tidak berbeda nyata.

