



SINTESIS O-KARBOKSIMETIL KITOSAN PADA BERBAGAI KONSENTRASI NaOH DAN SUHU REAKSI SERTA APLIKASINYA SEBAGAI ANTIBAKTERI

[Synthesis of O-Carboxymethyl Chitosan in Various of NaOH Concentrations and The Reaction Temperature and Applied as Antibacterial]

Jaya Hardi^{1*}, Nurakhirawati¹, Ahmad Ridhay¹, Musdalifah¹

¹⁾Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Tadulako
Jl. Soekarno Hatta, Kampus Bumi Tadulako Tondo Palu, Telp. 0451- 422611

Diterima 14 Desember 2016, Disetujui 28 Januari 2017

ABSTRACT

The research about the influence of NaOH concentrations and reaction temperature to O-Carboxymethyl Chitosan (O-CMC) synthesis and it is antibacterial application was done. This research intent on detect NaOH concentration and reaction temperature that resulting of O-CMC with highest of yield, solubility, and substitution degrees, and also to find out FTIR spectrum and antibacterial activity of O-CMC. The produce of O-CMC was done by using a Completely Randomized Design (CRD) with the variation of NaOH concentration of 20%, 30%, 40%, 50%, and 60%, and also reaction temperature of 20, 30, and 40oC. The result was showed that on the NaOH concentration of 60% (w/v) and temperature of 30oC was resulted highest of yield, solubility, and substitution degrees of 41.5%, 31 g/L, and 0.67, respectively. FTIR spectrum was showed that bending vibration of primary amine (-NH₂) give two bands for O-CMC. The broadest inhibition area of O-CMC (1.43 cm) was showed on *Salmonella sp.*

Keywords: *chitosan, O-CMC, substitution degree, antibacterial*

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian tentang pengaruh konsentrasi NaOH dan suhu terhadap proses sintesis O-karboksimetil kitosan (O-KMK) dan aplikasinya sebagai antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi NaOH dan suhu reaksi yang dapat menghasilkan O-KMK dengan rendemen, kelarutan, dan derajat substitusi tertinggi, dan pola spektrum FTIR O-KMK, serta untuk mengetahui daya hambat antibakteri dari O-KMK yang dihasilkan. Pembuatan O-KMK dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan variasi konsentrasi NaOH 20, 30, 40, 50, dan 60% dan suhu reaksi 20, 30 dan 40°C. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada konsentrasi NaOH 60% (b/v) dan suhu 30°C menghasilkan rendemen, kelarutan, dan DS tertinggi, masing 41,5%; 31 g/L; 0,67. Spektrum FTIR menunjukkan terbentuknya sepasang pita serapan vibrasi tekuk -NH₂ primer atau terbentuk O-KMK. O-KMK hasil sintesis menghasilkan daya hambat tertinggi pada bakteri *Salmonella sp.* (1,43 cm).

Kata kunci: *kitosan, O-KMK, derajat substitusi, antibakteri*

*) Corresponding Author : jr.hardi0803@gmail.com (hp/fax: +628114538600)

LATAR BELAKANG

Kitosan atau poli-(2-amino-deoksi- β -(1-4)-D-glukopiranososa merupakan turunan dari kitin melalui proses deasetilasi dengan menggunakan basa kuat pada temperatur yang cukup tinggi (Kurita, 2006). Kitosan memiliki fungsi yang banyak, akan tetapi kelarutan kitosan yang rendah dalam air membatasi pemanfaatannya. Oleh karena itu, banyak dilakukan modifikasi struktur kimia kitosan untuk meningkatkan kelarutannya. Salah satu modifikasi tersebut adalah karboksimetil kitosan. Chen *et al.*, (2003) memodifikasi kitosan dengan asam kloroasetat pada suhu rendah untuk mendapat produk yang larut air berupa senyawa O-karboksimetil kitosan.

Karboksimetil kitosan (KMK) merupakan produk hasil sintesis yang diperoleh dengan cara substitusi gugus karboksimetil pada rantai glukosamin pada struktur kitosan. Senyawa ini memiliki kelarutan yang lebih tinggi dalam air daripada kitosan akibat pertambahan muatan ionik. Penelitian Patale & Patravale (2011) menunjukkan selain memperbaiki kelarutan kitosan, karboksilasi juga mampu meningkatkan sifat fungsional kitosan. Karboksimetil kitosan terbagi dalam 4 jenis senyawa yaitu N-, O-, N-O, dan N-N-KMK.

Pembuatan karboksimetil kitosan dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya rasio antara kitosan terhadap asam monokloroasetat, kemurnian kitosan, suhu reaksi, dan konsentrasi

NaOH pada proses alkalisasi (Kurita, 2006). Jumlah alkalis kitosan yang diperoleh (proses alkalinasi) juga berpengaruh dalam pembentukan KMK. Banyaknya jumlah alkali (NaOH) yang ditambahkan pada kitosan dalam proses alkalinasi mempengaruhi jumlah ion Na^+ yang diikat oleh kitosan. Basmal dkk., (2005) melaporkan bahwa alkalinasi menggunakan NaOH 50% pada berbagai perlakuan konsentrasi asam monokloroasetat menghasilkan O-karboksimetil kitosan dengan tingkat kelarutan dalam air sebesar 9,85 ml /1 g KMK, sedangkan penelitian berikutnya oleh Basmal dkk., (2007) menggunakan NaOH 5% menghasilkan NO-karboksimetil kitosan (NO-KMK) dengan jumlah kitosan yang terlarut dalam air sebesar 5,37%. Sementara itu, Saputra (2014) melaporkan penggunaan NaOH 10M dapat menghasilkan KMK dengan rendemen yang tinggi pada sekitar pH 4.

O-KMK biasanya dapat disintesis pada rasio kitosan terhadap asam (1:4) dan pada suhu yang rendah, yaitu 0-30°C. Sementara suhu 30°C hingga 60°C dapat menghasilkan campuran N-O-KMK dan O-KMK. Sementara itu, konsentrasi kitosan yang sering digunakan adalah 4 - 20 % (b/v) dalam 40 – 50% (b/v) larutan NaOH. Pada proses eterifikasi, konsentrasi asam monokloroasetat yang biasa digunakan adalah 1:1, 1:4, dan 1:6 dalam isopropanol/etanol (b/v). Sementara itu, O-KMK memiliki sifat antibakteri yang lebih tinggi daripada kitosan dan N-O-KMK,

sehingga O-KMK memiliki potensi yang sangat besar pada peningkatan nilai ekonomis turunan kitosan (Mourya *et al.*, 2010).

Belum dilakukannya kajian tentang penggunaan berbagai variasi NaOH yang selanjutnya dihubungkan dengan suhu reaksi terhadap mutu O-KMK hasil sintesis, sehingga perlu adanya penelitian lanjut ke arah tersebut dan selanjutnya digunakan untuk mengkaji aktivitas antibakteri dari senyawa O-KMK.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Peralatan

Alat yang diperlukan dalam penelitian ini adalah oven, desikator, magnetik stirrer, neraca analitik, blender, *homogenizer*, *water bath*, sentrifugasi, *laminar flow*, pH meter, Spektrofotometer *Fourier Transform Infra Red* (FTIR) ATR alpha Bruker, dan alat-alat gelas yang umum di laboratorium kimia.

Bahan dalam penelitian ini adalah kitosan, NaOH, natrium monokloroasetat, asam asetat glasial, methanol 70%, Isopropil alkohol, bakteri *Staphylococcus aureus*, *E. coly*, dan *Salmonela sp.*, aquades, indikator metil merah, HCl 0,13 M, NaCl fisiologis, media NA, kapas.

Prosedur Penelitian

Penelitian dilakukan dengan menggunakan rancangan acak lengkap dengan dua faktor yaitu konsentrasi NaOH (20, 30, 40, 50, dan 60%) dan suhu sintesis (20, 30, dan 40°C).

Sintesis O-Karboksimetil Kitosan

Senyawa O-KMK disintesis dengan menggunakan metode Chen *et al.* (2003) dengan beberapa modifikasi. 2 gram kitosan ditambah 50 mL isopropil alkohol dan dikocok menggunakan magnetik stirrer pada suhu ruang selama 2 jam. Suspensi yang terbentuk selanjutnya ditambahkan 40 mL NaOH dengan konsentrasi sesuai perlakuan. Campuran diaduk dengan magnetik stirrer selama 2 jam pada temperatur ruang, kemudian 8 gram asam monokloro asetat di dalam 24 mL isopropil alkohol ditambahkan tetes demi tetes kedalam campuran. Campuran selanjutnya dihomogenizer selama 2 jam pada suhu sesuai perlakuan. Hasil homogenizer kemudian dinetralkan dengan asam asetat glasial, setelah itu campuran hasil penetralan disaring. Endapan yang terbentuk dicuci dengan metanol 70% dengan perbandingan 1:15, endapan kembali disaring dan selanjutnya dikeringkan dalam oven suhu 60°C semalaman. Padatan kering selanjutnya digiling untuk mendapatkan serbuk O-KMK. Serbuk O-KMK ditentukan rendemen, kelarutan, derajat substitusi dan pola spektrum FTIR. O-KMK dengan hasil terbaik selanjutnya diuji aktivitas antibakterinya.

Uji Aktivitas Antibakteri (Nurainy *et al.*, 2008)

Pengujian ini menggunakan metode sumur difusi dengan cara suspensi bakteri uji yang telah disiapkan dioleskan merata pada media Nutrien Agar, selanjutnya

dibuat empat sumur/ lubang. Dua sumur ditetesi pelarut sebagai kontrol negatif, sedangkan dua sumur lainnya ditetesi masing-masing dengan O-KMK dan kitosan dengan konsentrasi 5%. Media uji selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Area yang jernih pada disekitar sumur diukur diameternya sebagai area zona hambatan bakteri.

HASIL DAN PEMBAHASAN

O-KMK Hasil Sintesis Pada Berbagai Konsentrasi NaOH

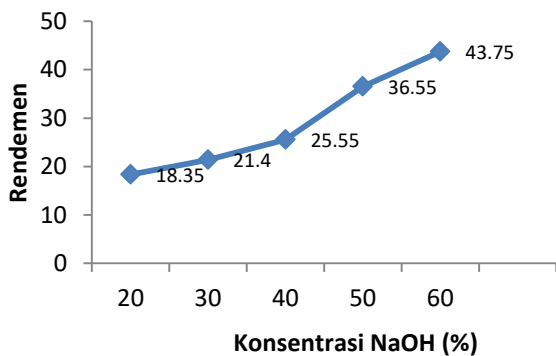
Hasil sintesis menunjukkan bahwa rendemen O-KMK meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi NaOH (Gambar 1). Peningkatan rendemen O-KMK disebabkan karena pada penggunaan konsentrasi NaOH yang semakin tinggi, maka semakin banyak pula kitosan alkali yang terbentuk sehingga meningkatkan kemampuan kitosan untuk berikatan dengan gugus karboksimetil. Rendemen O-KMK tertinggi diperoleh penggunaan NaOH 60%, yaitu 43,75%.

Kualitas O-KMK yang dihasilkan dapat ditinjau pada kelarutannya dalam air. Adanya substitusi gugus karboksimetil dari asam monokloroasetat pada kitosan maka terdapat gugus polar tambahan dalam molekul yang menyebabkan O-KMK dapat larut dalam air. Analisis kelarutan untuk pengaruh konsentrasi NaOH menunjukkan bahwa kelarutan karboksimetil kitosan berkisar antara 14 hingga 30,5 g/L (Gambar 2). Seperti halnya rendemen, kelarutan O-KMK juga meningkat seiring dengan meningkatnya

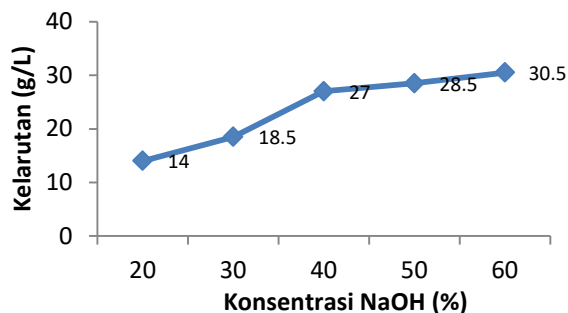
konsentrasi NaOH. Hal ini tidak lepas dari semakin banyaknya NaOH tentu akan mengaktifkan gugus $-OH$ semakin banyak, sehingga kemampuan untuk berikatan dengan karbokation ($^+CH_2COOCl$) akan tinggi. Banyaknya gugus CH_2COO^- yang terikat pada kitosan tentunya akan meningkatkan kepolaran dan meningkatkan pula kelarutannya.

Derajat substitusi merupakan parameter selanjutnya yang harus dikaji pada sintesis O-KMK. Nilai derajat substitusi tertinggi pada O-KMK hasil sintesis diperoleh pada penggunaan NaOH 60%, yaitu 0,66 (Gambar 3). Penggunaan NaOH dengan konsentrasi yang semakin tinggi akan meningkatkan jumlah ion Na^+ yang selanjutnya bereaksi dengan kitosan membentuk kitosan alkali. Oleh karena itu, pada saat penambahan natrium monokloroasetat akan terjadi pertukaran ion, yakni ion Na^+ yang mudah larut dalam air akan terikat dengan ion Cl^- dari monokloroasetat dan membentuk garam $NaCl$. Kitosan yang telah melepaskan ion Na^+ akan bersifat reaktif terhadap gugus karboksil dari monokloroasetat sehingga membentuk KMK (Rahmawati dan Iskandar, 2014).

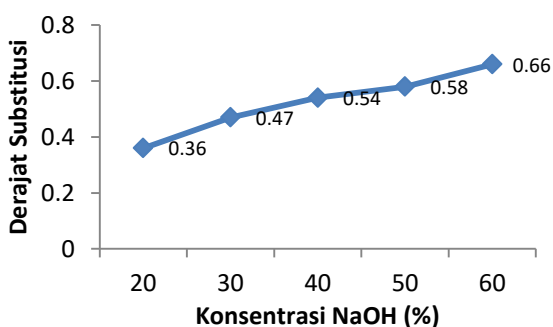
Hasil analisis spektrum FTIR senyawa O-KMK (Gambar 4) menunjukkan bahwa pada bilangan gelombang sekitar 1653 cm^{-1} dan 1561 cm^{-1} diasumsikan sebagai pasangan serapan vibrasi tekuk untuk gugus N-H primer sebagai ciri bahwa substitusi sebagian besar terjadi pada gugus $-OH$.



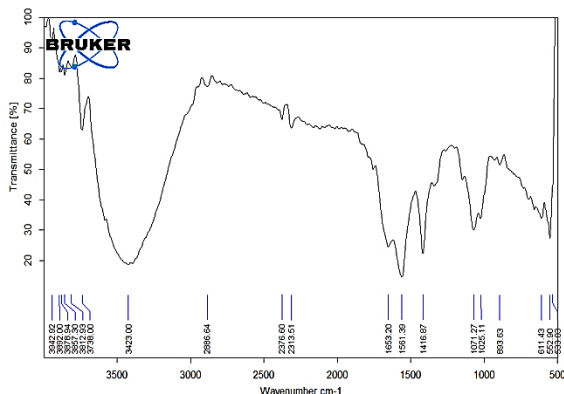
Gambar 1. Rendemen O-KMK pada berbagai konsentrasi NaOH



Gambar 2. Kelarutan O-KMK pada berbagai konsentrasi NaOH



Gambar 3. DS O-KMK pada berbagai konsentrasi NaOH



Gambar 4. Hasil analisis FTIR pada penggunaan NaOH 60%

O-KMK Hasil Sintesis pada Berbagai Suhu Sintesis.

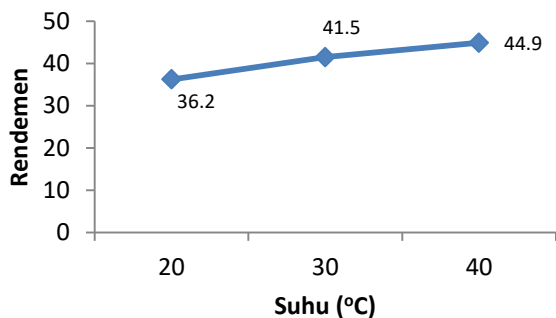
Perlakuan suhu terhadap rendemen O-KMK yang dihasilkan menunjukkan peningkatan hingga rendemen tertinggi 44,9% pada suhu 40°C (Gambar 5). Akan tetapi, berdasarkan uji statistik diperoleh bahwa rendemen pada suhu 30°C dan 40°C memiliki perbedaan yang tidak nyata atau dengan kata lain penggunaan suhu 30°C lebih efisien. Peningkatan jumlah rendemen disebabkan oleh semakin banyaknya karbo kation yang terbentuk dari natrium monokloro asetat pada saat suhu meningkat. Dengan demikian, reaksi eterifikasi semakin berjalan efektif atau substitusi gugus $-CH_2COO^-$ semakin banyak.

Penggunaan suhu sintesis yang tinggi pada reaksi eterifikasi cenderung tidak mempengaruhi kelarutan O-KMK (Gambar 6). Sintesis O-KMK pada suhu 30°C dan 40°C menghasilkan kelarutan yang paling tinggi, yaitu 31 g/L. Akan tetapi penggunaan suhu di atas 30°C tidak dianjurkan pada sintesis O-KMK, karena substitusi dapat terjadi pada gugus amina kitosan (Mourya *et.al.*, 2010). Rahmawati dan Iskandar (2014) melaporkan kelarutan KMK pada suhu 60°C adalah 27,7 g/L.

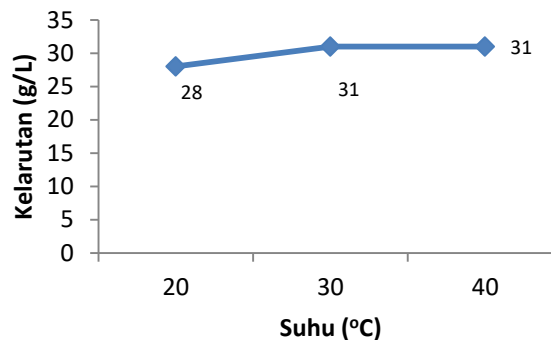
Derajat substitusi yang diperoleh pada perlakuan suhu berkisar antara 0,48 hingga 0,7 dengan nilai tertinggi pada perlakuan suhu 40°C (Gambar 7), akan tetapi secara statistik (uji ANOVA) berbeda tidak nyata dengan suhu 30°C (0,67). Mouriya *et al.*, (2010)

mengemukakan bahwa KMK dengan DS $\pm 0,82$ umumnya dalam bentuk O-KMK yang tersubstitusi pada posisi C6, sedangkan DS $\pm 0,65$ membentuk O-KMK yang tersubstitusi pada posisi C3 dan C6, serta untuk DS $\pm 0,5$ umumnya membentuk N-KMK atau substitusi terjadi pada posisi amina. Berdasarkan data yang diperoleh, maka penggunaan suhu 30°C dan 40°C diasumsikan bahwa menghasilkan O-KMK yang tersubstitusi pada posisi C3 dan C6.

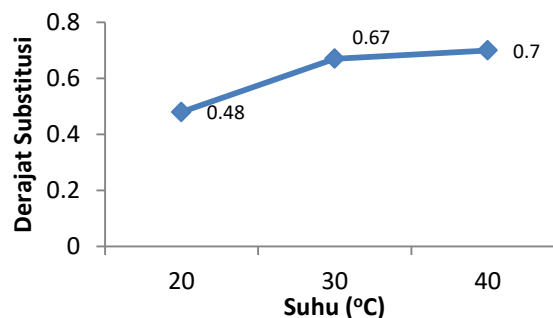
Hasil penelitian menunjukkan bahwa spektrum FTIR karboksimetil kitosan yang disintesis dengan perlakuan suhu $20-40^{\circ}\text{C}$ menunjukkan terbentuknya gugus karboksimetil pada senyawa kitosan (Gambar 8). Terlihat bahwa vibrasi ulur gugus -OH untuk terserap pada bilangan gelombang 3410 cm^{-1} . Pada bilangan gelombang 2977 cm^{-1} dan 2938 cm^{-1} merupakan serapan gugus fungsi -C-H. Serapan pada 1649 cm^{-1} dan 1569 cm^{-1} diasumsikan sebagai vibrasi tekuk untuk gugus -N-H primer. Mourya *et.al.*, (2010) melaporkan bahwa vibrasi tekuk gugus NH^{3+} berada pada bilangan gelombang 1624 dan 1506 cm^{-1} .



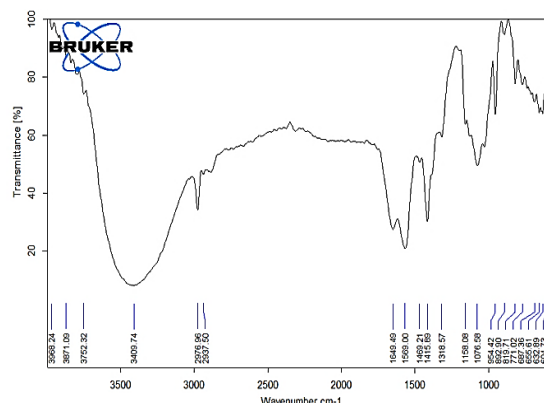
Gambar 5. Rendemen O-KMK pada berbagai suhu



Gambar 6. Kelarutan O-KMK pada berbagai suhu



Gambar 7. Derajat substitusi pada berbagai suhu



Gambar 8. Hasil analisis FTIR pada suhu 30°C

Aktivitas Antibakteri O-KMK

Pengujian daya hambat senyawa O-KMK hasil sintesis terpilih dilakukan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* (bakteri Gram positif), *Escherichia coli* (bakteri Gram negatif) dan *Salmonella sp.* (bakteri Gram negatif). Pengamatan zona hambat terhadap *Staphylococcus aureus* menunjukkan diameter zona hambat dari

kitosan sebagai pembanding diperoleh 0,27 cm hampir sama dengan O-KMK hasil sintesis dengan zona hambat 0,24 cm. Pada bakteri *Escherichia coli*, zona hambat O-KMK yaitu 0,27 cm, sedangkan pada kitosan tidak terdapat zona hambat. Zona hambat bakteri *Salmonella sp* yang paling besar juga terdapat pada penggunaan O-KMK, yaitu 1,43 cm dan pada kitosan hanya 0,40 cm. Data tersebut cukup membuktikan bahwa O-KMK lebih efektif sebagai antibakteri dibandingkan dengan kitosan tanpa modifikasi khususnya pada bakteri Gram negatif, yaitu *Escherichia coli* dan *Salmonella sp*.

Sifat antibakteri dari senyawa O-KMK terjadi karena pada O-KMK substitusi hanya terjadi pada –OH, sedangkan pada –NH₂ tidak terjadi perubahan. Oleh karena itu, gugus –COOH akan mengalami reaksi inter- ataupun intramolekular dengan gugus –NH₂ tadi dan menghasilkan gugus –NH³⁺ yang lebih banyak dibandingkan pada kitosan. Gugus inilah yang nantinya sangat efektif sebagai antibakteri (Mourya *et al.*, 2010).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa penggunaan konsentrasi NaOH dan suhu sintesis terbaik didapatkan pada konsentrasi 60% dan suhu 30°C dengan rendemen 41,5%, kelarutan 31 g/L, dan DS 0,67. O-KMK menghasilkan bilangan gelombang sekitar 1650 cm⁻¹ dan 1560 cm⁻¹ sebagai serapan

vibrasi tekuk untuk gugus N-H primer. O-KMK memiliki daya hambat yang tinggi pada bakteri *Salmonella sp*. dengan diameter daya hambat 1,43 cm.

Berdasarkan hasil yang diperoleh maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh derajat deasetilasi kitosan terhadap sintesis O-KMK.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih dihaturkan kepada jajaran pimpinan Faklutas MIPA Universitas Tadulako yang telah memberikan Insentif Penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Basmal, J., Prasetyo, A., dan Fawzya, Y.N., 2005, Pengaruh Konsentrasi Asam Monokloroasetat dalam proses Karboksimetil Kitosan terhadap Karboksimetil Kitosan yang dihasilkan. *J. Penel. Perik, Indonesia*. 11(8): 47-58.
- Basmal. J., Prasetyo, A., dan Farida, Y. 2007. Pengaruh Suhu Eterifikasi pada Pembuatan Karboksimetil Kitosan. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Per-ikanan*. 2(2): 99-106.
- Chen, X.G., and Park, H.J. 2003. Chemical Characteristic of O-Carboxymethyl Chitosan Related to the Preparation Conditions. *Carbohydrate Polymer*. 53 : 355-359.
- Kurita, K. 2006. Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans (Mini Review). *Marine Biotechnology*. 8:203–226.
- Mourya, V.K., Inandar, N.N., Tiwari, A. 2010. Carboxymethyl Chitosan and Its Aplicacions. [Review]. *Adv Mat. Left*. 1 (1):11-33.
- Nurainy F, Rizal S, Yudiantoro. 2008. Pengaruh Konsentrasi Kitosan

- Terhadap Aktivitas Antibakteri dengan Metode Difusi Agar (Sumur). *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian*. 13(2): 117-125.
- Patale, R.L. & V.B. Patravale. 2011. O,N-carboxymethyl chitosan–zinc complex: A novel chitosan complex with enhanced antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymers*. 85: 105–110.
- Rahmawati H., Iskandar D. 2014. Sintesis Karboksimetil Kitosan Terhadap Pengaruh Konsentrasi Natrium Hidroksia dan Rasio Kitosan Dengan Asam Monokloro Asetat. *Jurnal Teknologi Technoscientia*. 6(2): 145-155.
- Saputra MJA. 2014. Karakterisasi Carboxymethyl Chitosan dengan Variasi Konsentrasi NaOH. [*Skripsi*]. Bogor: Departemen THP IPB.