

**ISOLASI, KARAKTERISASI KITIN DAN KITOSAN DARI CANGKANG
KEONG SAWAH (*Pila ampullacea*) SERTA APLIKASINYA
SEBAGAI ANTIBAKTERI SECARA *INVITRO***

MIFTAHUDDIN

H311 16 514



**DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

**ISOLASI, KARAKTERISASI KITIN DAN KITOSAN DARI CANGKANG
KEONG SAWAH (*Pila ampullacea*) SERTA APLIKASINYA
SEBAGAI ANTIBAKTERI SECARA *INVITRO***

*Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Sains*

Oleh:

MIFTAHUDDIN

H311 16 514



MAKASSAR

2021

LEMBAR PENGESAHAN (TUGAS AKHIR)

**ISOLASI, KARAKTERISASI KITIN DAN KITOSAN DARI CANGKANG
KEONG SAWAH (*Pila ampullacea*) SERTA APLIKASINYA
SEBAGAI ANTIBAKTERI SECARA *INVITRO***

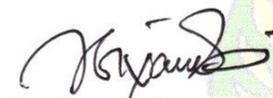
Disusun dan diajukan oleh:

**MIFTAHUDDIN
H311 16 514**

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Program Srajana Program Studi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin pada tanggal 13 Agustus 2021 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

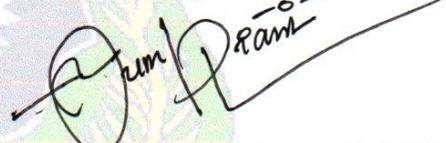
Menyetujui,

Pembimbing Utama,



Dr. Rugayah A Arfah, M.Si
NIP. 19611231 198702 2 002

Pembimbing Pertama,



Dr. Nur Umriani Permatasari, M.Si
NIP. 19811209 200604 2 003

Ketua Departemen Kimia,



Dr. Abd. Karim, M.Si
NIP. 19620710 198803 1 002

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Miftahuddin
NIM : H311 16 514
Program Studi : Kimia
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa Skripsi dengan judul

ISOLASI, KARAKTERISASI KITIN DAN KITOSAN DARI CANGKANG
KEONG SAWAH (*Pila ampullacea*) SERTA APLIKASINYA
SEBAGAI ANTIBAKTERI SECARA *INVITRO*

adalah karya saya sendiri dan tidak melanggar hak cipta pihak lain. Apabila dikemudian hari terbukti bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah hasil karya orang lain yang saya pergunakan dengan cara melanggar hak cipta pihak lain, maka saya bersedia menerima sanksi.

Makassar, 13 Agustus 2021

Yang Menyatakan


Miftahuddin

PRAKATA

Segala puji hanya milik Allah Swt. Yang telah memecahkan sumber-sumber hikmah beserta pengetahuan dari hati orang-orang yang beriman dan senantiasa berpikir. Dengan pengetahuan itu, Tuhan menyibak rahasia-rahasia alam sehingga hamba-Nya semakin tunduk atas kuasa-Nya. Beserta hikmah itu pula, semoga Tuhan selalu merahmati kami, sehingga kami dapat menyusun dan menyelesaikan penelitian ini dengan judul **“Isolasi, Karakterisasi Kitin dan Kitosan dari Cangkang Keong Sawah (*Pila ampullacea*) serta Aplikasinya sebagai antibakteri Secara *InVitro*”** sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains. Shalawat beserta salam semoga tetap tercurah limpah kepada baginda Rasulullah Saw. Sang *Khataman Nabiyyin*, penutup para nabi yang telah mengemban amanah guna menyempurnakan akhlaq manusia.

Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada ibu **Dr. Rugaiyah A. Arfah, M.Si** dan ibu **Dr. Nur Umriani Permatasari, M.Si.**, selaku dosen pembimbing yang dengan penuh kesabaran, ketelatenan dan keikhlasan telah meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan serta pengarahan selama penyusunan skripsi ini, kepada kedua orang tua kami tercinta, **Makmur** dan **Maryani Z.** yang telah membesarkan penulis dengan cinta kasih, menyulap bumi penulis menjadi permata, dan membentuk semesta penulis laksana surga, sehingga penulis mempunyai visi untuk senantiasa membahagiakan keduanya.

Rasa hormat dan terima kasih penulis juga sampaikan kepada:

1. Ibu rektor Universitas Hasanuddin Prof. Dr. **Dwia Aries T. Pulubuhu, MA** beserta staf
2. Bapak Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin **Eng. Amiruddin** beserta seluruh staf
3. Bapak ketua S-1 departemen Kimia Universitas Hasanuddin **Dr. Abd. Karim M.Si** beserta staf
4. Tim dosen penguji Ibu **Dr. Hj. Nursiah La Nafie, M.Sc** dan Bapak **Drs. F.W. Mandey, M.Sc**
5. Bapak dan Ibu dosen departemen Kimia Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin
6. Kawan **Izzah Mauryza** yang menjadi partner dalam menyelesaikan skripsi ini
7. Saudara-saudariku “**Kromofor 2016**” yang dengannya penulis bersama-sama merawat pohon rindang kebersamaan. Semoga pohon ini senantiasa terjaga sampai kapanpun
8. **Semua pihak** yang tidak sempat kami sebut namanya yang telah memberikan bantuan, dukungan dan do’a kepada penulis

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dan kesalahan dalam penyusunan proposal ini, oleh karena itu saran dan kritik yang membangun sangat penulis harapkan, agar tercipta karya yang lebih baik lagi kedepannya.

Penulis

2021

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi kitin dan kitosan dari cangkang keong sawah (*Pila ampullacea*) dengan metode kimiawi yang meliputi proses deproteinasi, demineralisasi, dan deasetilasi. Kemudian mengkarakterisasi dan menentukan efektivitas kitosan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Kondisi optimum yang didapatkan pada proses deproteinasi adalah pada konsentrasi NaOH 1 %, waktu pengadukan 60 menit, dan temperatur homogenasi 100 °C. Kondisi optimum demineralisasi pada konsentrasi HCl 1,5 M dan waktu pengadukan 240 menit. Karakteristik kitin dan kitosan adalah memiliki kadar air kitin dan kitosan sebesar 0,42 % dan 0,34 %, kadar abu 0,97 % dan 0,89 %, N-total 6,19 % dan 2,34 %, serta derajat deasetilasi 79,50 % dan 86,57 %. Pengujian kitosan sebagai antibakteri terhadap *E. coli* menunjukkan bahwa kitosan dapat menghambat pada konsentrasi tertinggi sebesar 1,5 % dengan pembentukan zona hambatan sebesar 6,3 mm. Selain itu, kitosan memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* dengan kemampuan menghambat tertinggi pada konsentrasi 1,5 % dengan pembentukan zona hambatan sebesar 3,4 mm.

Kata kunci: antibakteri; isolasi; keong sawah; kitin; kitosan.

ABSTRACT

The aim of the study was to isolate chitin and chitosan from the shells of rice snail (Pila ampullacea) by chemical methods including deproteination, demineralization, and deacetylation processes. In addition, this study has characterized and determined the effectiveness of chitosan in inhibiting the growth of E. coli and S. aureus bacteria. The optimum conditions that have been obtained in the deproteination process are at 1% NaOH concentration, stirring time of 60 minutes, and homogenization temperature of 100 °C. The optimum demineralization conditions were at a concentration of 1.5 M HCl and a stirring time of 240 minutes. The characteristics of chitin and chitosan respectively have water content of 0.42% and 0.34%, ash content of 0.97% and 0.89%, N-total 6.19% and 2.34%, and the degree of deacetylation 79.50 % and 86.57 %. Testing of chitosan as an antibacterial against E. coli showed that chitosan could inhibit the highest concentration of 1.5% with the formation of an inhibition zone of 6.3 mm. In addition, chitosan has antibacterial activity against S. aureus with the highest inhibitory ability at a concentration of 1.5% with the formation of an inhibition zone of 3.4 mm.

Keywords: antibacterial; chitin; chitosan; isolation; rice snails.

DAFTAR ISI

	Halaman
PRAKATA.....	iv
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACK.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR ARTI SIMBOL DAN SINGKATAN.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian.....	5
1.3.1 Maksud Penelitian.....	5
1.3.2 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Kitosan.....	7
2.1.1 Isolasi Kitosan.....	10
2.1.2 Sifat dan Karakteristik Kitosan.....	11
2.1.3 Kitosan Sebagai Antibakteri.....	13
2.2 Keong Sawah (<i>Pila ampullacea</i>).....	14

2.2.1 Klasifikasi Keong Sawah	14
2.2.2 Nutrisi Keong Sawah	15
2.3 Bakteri	17
2.3.1 Media Pertumbuhan Bakteri	19
2.3.2 Metode Pengujian Antibakteri	21
2.3.3 Bakteri Uji	22
2.4 Metode Respon Permukaan	26
BAB III METODE PENELITIAN.....	28
3.1 Bahan Penelitian.....	28
3.2 Alat Penelitian	28
3.3 Waktu dan tempat penelitian	28
3.4 Prosedur Penelitian.....	29
3.4.1 Preparasi Cangkang Keong Sawah.....	29
3.4.2 Isolasi Kitin	29
3.4.2.1 Optimasi Deproteinasi	29
3.4.2.2 Optimasi Demineralisasi	30
3.4.3 Produksi Kitin pada Kondisi Optimum.....	30
3.4.4 Pembuatan Kitosan.....	31
3.4.5 Karakterisasi Kitin dan Kitosan	32
3.4.5.1 Analisis Derajat Deasetilasi	32
3.4.5.2 Pengujian Kadar Air.....	31
3.4.5.3 Pengujian Kadar Abu	33
3.4.6 Uji Anti Bakteri.....	34
3.4.6.1 Pembuatan <i>Media Mueller Hilton</i> Agar	34
3.4.6.2 Pembuatan Larutan Kitosan	35

3.4.6.4 Pengujian Aktivitas Antibakteri	35
3.4.7 Analisis Statistik	35
BAB IV HASIL PENELITIAN	35
4.1 Optimasi Deproteinasi.....	36
4.2 Optimasi Demineralisasi	42
4.3 Analisis Gugus Fungsi dan Derajat Deasetilasi Kitin	46
4.4 Produksi Kitosan	49
4.5 Karakterisasi Kitin dan Kitosan	51
4.5.1 Kadar Air.....	52
4.5.2 Kadar Abu	53
4.5.3 Kadar N-total.....	54
4.5.4 Analisis Derajat Deasetilasi Kitosan	55
4.6 Uji Aktivitas Anti Bakteri	57
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	62
5.1 Kesimpulan.....	62
5.2 Saran.....	62
DAFTAR PUSTAKA	63
LAMPIRAN.....	70

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Karakteristik gugus fungsi kitosan standar	7
2. Sumber Kitin dan Kitosan	8
3. Karakteristik kitin dan kitosan	11
4. Penggolongan Bakteri	16
5. Klasifikasi Respon Hambatan Pertumbuhan Bakteri	20
6. Analysis of Variance (ANOVA) respon optimasi konsentrasi, temperatur dan waktu pengadukan dalam proses deproteinasi.....	36
7. Analysis of Variance (ANOVA) respon optimasi konsentrasi, temperatur dan waktu pengadukan dalam proses demineralisasi	42
8. Karakteristik gugus fungsi kitin dari cangkang keong sawah.....	48
9. Hasil uji kadar air, kadar abu, kadar N-total dan derajat deasetilasi.....	49
10. Perbandingan karakteristik kitosan dari berbagai cangkang dan kulit...	52
11. Pembacaan hasil FTIR kitosan.....	56
12. Diameter hambatan rata-rata kitosan dari cangkang keong sawah (<i>Pila ampullacea</i>) terhadap bakteri <i>E. Coli</i> dan <i>S. aureus</i>	56

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Struktur Kimia Kitin	6
2. Spektrum infra merah kitosan standar.....	7
3. Struktur Kimia Kitosan	9
4. Proses Isolasi Kitin Menjadi Kitosan.....	10
5. Keong Sawah (<i>Pila ampullacea</i>)	14
6. Bakteri <i>Escherichia Coli</i>	22
7. Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> Dilihat dari Mikroskop Elektron	24
8. Visualisasi Model CCD	27
9. Penentuan titik optimum pada proses deproteinasi	40
10. Variasi optimasi tahap deproteinasi	41
11. Mekanisme reaksi tahap deproteinasi	42
12. Penentuan titik optimum pada proses demineralisasi	45
13. Variasi optimasi tahap demineralisasi	46
14. Spektrum inframerah kitin hasil penelitian dan kitin standar	47
15. Kitosan hasil isolasi dari cangkang keong sawah	50
16. Mekanisme reaksi pembentukan kitosan dari kitin	51
17. Spektrum infra merah kitosan hasil penelitian dan kitosan standar	55

DAFTAR ARTI SIMBOL DAN SINGKATAN

Simbol/Singkatan	Arti
DNA	Deoxyribonucleic Acid
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
NA	<i>Nutrient Agar</i>
TSB	<i>Trypticase Soy Broth</i>
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
PDA	<i>Potato Dextose Agar</i>
EMBA	<i>Eosin Methylene Blue Agar</i>
KHM	Kadar Hambat Minimum
KBM	Kadar Bunuh Minimum
rRNA	<i>Ribosomal Ribonucleic Acid</i>
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
CKS	Cangkang Keong Sawah
RSM	<i>Response Surface Methodology</i>
CCD	<i>Central Composite Design</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Diagram Alir Tahapan Penelitian.....	70
2. Bagan Kerja Optimasi Isolasi Kitin	71
3. Bagan Kerja Produksi Kitosan pada Kondisi Optimum	71
4. Bagan Kerja Karakterisasi Kitin dan Kitosan	73
5. Bagan Kerja Pembuatan Media.....	74
6. Bagan Kerja Uji Aktivitas Anti Bakteri	75
7. Perhitungan Optimasi Deproteinasi	76
8. Perhitungan Optimasi Demineralisasi.....	77
9. Perhitungan Kadar Kitin dan Kitosan	78
10. Perhitungan Kadar N-total Kitin dan Kitosan.....	79
11. Perhitungan Derajat Deasetilasi	80
12. Validasi Optimasi Proses Deproteinasi dan Demineralisasi	82
13. Plot Kontur Optimasi Deproteinasi.....	83
14. Plot Kontur Optimasi Demineralisasi	84
15. Sertifikat Hasil Uji Kadar Air dan Abu.....	85
16. Data FTIR Kitosan	86
17. Data FTIR Kitin	87
18. Dokumentasi Penelitian	88
19. Hasil Uji Anti Bakteri Kitosan Cangkang Keong Sawah	89

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia adalah negara berbasis agraria yang besar. Berdasarkan data Badan Pusat Statistik (2019), bahwa luas lahan baku sawah di Indonesia per tahun 2019 adalah sebanyak 7,46 juta hektar. Sawah menjadi habitat yang sangat disukai oleh hewan air seperti keong sawah. Keong sawah (*Pila ampullacea*) merupakan hewan moluska dari kelas gastropoda. Keong sawah jenis ini banyak ditemukan di sawah yang pada umumnya menjadi hama karena memakan batang padi yang baru ditanam sehingga mengganggu pertumbuhan padi. Selain menjadi hama, keong sawah juga belum dimanfaatkan secara maksimal. Pemanfaatan keong sawah masih terbatas pada konsumsi daging keong oleh masyarakat, sehingga menyebabkan cangkangnya sangat melimpah dan mudah ditemukan. Namun, pemanfaatan limbah cangkang belum dilakukan secara optimal, padahal dalam cangkang gastropoda terdapat kandungan utama kitin yang menjadi bahan baku pembuatan kitosan. Penelitian yang dilakukan oleh Hendrawan dan Rachmawani, (2011) memperoleh 33 gram kitosan yang diisolasi dari 385 gram sampel cangkang keong bakau (*Telescopium* sp). Selain itu, Kusumaningsih dkk (2004) menyebutkan cangkang kering dari jenis Gastropoda mengandung rata-rata 20-50 % kitin. Kaewwboonruang (2016) mengisolasi kitosan dari cangkang keong mas (*Pomacea canaliculata*) dan mendapatkan kitosan dengan karakteristik kadar air 2,88 %, kadar abu 1,65 %, dan derajat deasetilasi 61 %.

Kitosan sebagai biopolimer alami merupakan hasil deasetilasi senyawa kitin menggunakan larutan alkali, maupun diproduksi secara enzimatik dengan enzim kitin deasetilase. Sumber potensial kitin adalah cangkang krustasea yang diketahui mengandung 30-40 % protein, 30-50 % kalsium karbonat dan 20-30 % kitin. Proporsi tersebut bervariasi tergantung pada jenis krustasea yang dijadikan bahan baku (Cho dkk., 1998). Selain dari limbah krustasea, kitin juga dapat diperoleh dari dinding sel jamur atau fungi tertentu (Shimosaka dkk., 1996). Kitin dapat diperoleh dengan menggunakan metode penghilangan protein (deproteinasi) menggunakan larutan alkali, dilanjutkan penghilangan mineral (demineralisasi) menggunakan larutan asam. Selanjutnya dilakukan proses dekolorisasi untuk menghilangkan warna dengan menggunakan aseton ataupun natrium hipoklorit. Selanjutnya kitosan dihasilkan dari kitin melalui proses deasetilasi atau pengurangan gugus asetil menggunakan larutan alkali dengan pemanasan pada suhu tinggi (Hargono, 2008).

Menurut Safitra dkk., (2015), kualitas kitin dan kitosan sangat dipengaruhi oleh kondisi pada saat proses isolasi. Beberapa faktor yang perlu diperhatikan antara lain konsentrasi pelarut yang digunakan, temperatur homogenasi, dan lama waktu isolasi. Ragam metode optimasi dapat digunakan untuk mengisolasi kitin dan kitosan pada kondisi optimum. Salah satu metode optimasi yang dapat digunakan adalah *Response Surface Methodology* (RSM). Metode ini pertama kali diperkenalkan oleh Box dan Wilson pada tahun 1951. RSM merupakan suatu metode gabungan antara teknik matematika dan statistika yang bertujuan untuk mencari kondisi optimum respon yang dipengaruhi oleh variabel-variabel bebas,

sehingga metode ini cocok digunakan dalam upaya untuk mengoptimasi proses isolasi kitin dan kitosan (Syafaat, 2015).

Semakin banyak gugus asetil yang hilang (derajat deasetilasi), maka semakin baik pula kualitas kitosan seiring dengan meningkatnya jumlah gugus amina pada kitosan. Spektrum infra merah kitosan mempunyai ciri gugus fungsi yang khas seperti gugus N-H dan O-H regangan (*Overlap*) yang terbaca pada bilangan gelombang 3441 cm^{-1} , gugus C=O (*Amide I*) pada 1662 cm^{-1} dan gugus C-N regangan (*Amide II*) pada bilangan gelombang 1554 cm^{-1} (Kadhim, 2016). Adanya gugus hidroksi (-OH) dan gugus amina (NH_2) pada kitosan menjadikannya potensial untuk diaplikasikan dalam berbagai bidang (Ghaedkk., 2012). Menurut Yulina (2011), derajat deasetilasi kitosan minimal untuk industri pangan adalah 70 %, sedangkan untuk industri kosmetika dan biomedis sedikitnya 80 dan 90 %.

Dewasa ini, kitosan telah diaplikasikan dalam berbagai produk seperti biomedis, pangan, kesehatan, fungisida, kosmetik dan sebagai koagulan dalam pengolahan limbah (Synowiecki dan Al-Khateeb, 2003). Kitosan bersifat nontoksik, terbarui, dapat didegradasi oleh alam dan bersifat biokompatibel sehingga menjadikannya berpotensi digunakan sebagai bahan baku benang jahitan pasca operasi, implant gigi, penyembuh luka, sistem transport obat (*drug delivery system*), dan sebagai material pelapis kapsul. Kitosan dapat digunakan sebagai antibakteri alternatif karena kitosan dapat aktif berinteraksi dengan sel, enzim atau matrik polimer yang bermuatan negatif serta sebagai bahan antibakteri (Lim, 2002). Kitosan dapat menghindarkan konsumen dari kemungkinan terjangkit penyakit tyfus. Selain itu kitosan dapat menghambat pertumbuhan berbagai

mikroba patogen penyebab penyakit (Kusumawati, 2009). Penelitian oleh Nurainy, dkk., (2008) melaporkan bahwa kitosan memiliki aktivitas penghambatan terhadap *E. coli* (bakteri Gram negatif) pada penambahan kitosan dengan konsentrasi 0,2 %. Sedangkan, aktivitas penghambatan kitosan sebagai antibakteri terhadap *S. aureus* dengan diameter penghambatan tertinggi pada penambahan kitosan dengan konsentrasi 0,2 % .

Bakteri adalah mikroorganisme bersel tunggal. Beberapa bakteri umumnya dapat memberikan dampak kesehatan bagi manusia seperti jenis bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Hal ini disebabkan *E. coli* bersifat patogen apabila berada di luar usus manusia sehingga bakteri ini sering digunakan sebagai indeks pencemaran air (Sumarsih, 2003). Bakteri *S. aureus* menghasilkan toksin yang tidak dapat dibunuh hanya dengan pemanasan sehingga seringkali terjadi keracunan makanan disebabkan oleh enterotoksin yang dihasilkan bakteri ini. Masing-masing bakteri tersebut adalah bakteri Gram positif (*S. aureus*) dan bakteri Gram negatif (*E. coli*) (Febriyanti, 2015).

Ditinjau dari uraian sebelumnya, perlu menentukan proses isolasi yang optimal untuk memproduksi kitin dan kitosan dengan mempertimbangkan pengaruh deproteinasi, demineralisasi, dan deasetilasi. Selain itu, kitosan diketahui banyak diaplikasikan pada bidang biomedis seperti digunakan sebagai produk antibakteri. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan pengujian terhadap kemampuan kitosan dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Berdasarkan hal tersebut maka perlu dilakukan penelitian tentang “*Isolasi, Karakterisasi Kitin dan Kitosan dari Cangkang Keong Sawah (Pila Ampullacea) serta Aplikasinya Sebagai Antibakteri Secara Invitro*”.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang maka dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

1. bagaimana kondisi optimum proses isolasi kitin dan kitosan dari limbah cangkang keong sawah ?
2. bagaimana karakteristik kitin dan kitosan dari limbah cangkang keong sawah ?
3. berapa kadar kitin dan kitosan dari limbah cangkang keong sawah dari proses isolasi secara optimum?
4. berapa konsentrasi kitosan yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* secara *invitro*?

1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

1.3.1 Maksud Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah diatas maka maksud dari penelitian ini adalah mengisolasi dan mengkarakterisasi kitin dan kitosan dari cangkang keong sawah serta menentukan aktifitasnya sebagai anti bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* secara *invitro*.

1.3.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. mengisolasi dan mengoptimasi produksi kitin dan kitosan dari cangkang keong sawah menggunakan metode *Response Surface Methodology*.
2. mengkarakterisasi gugus fungsi aktif, kadar air, kadar abu, kadar N-Total dan derajat deasetilasi kitin dan kitosan dari cangkang keong sawah.

3. menentukan kadar kitin dan kitosan dari limbah cangkang keong sawah pada kondisi optimum.
4. menentukan konsentrasi kitosan yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* secara *invitro*.

1.4 Manfaat Penelitian

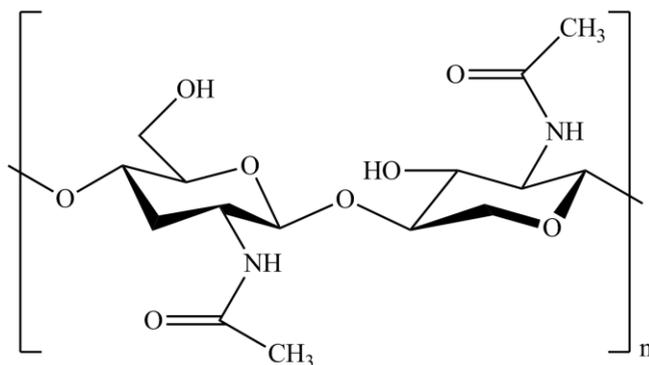
Manfaat yang diperoleh dari penelitian ini adalah sebagai upaya dalam pemanfaatan limbah cangkang keong sawah dan memberikan informasi mengenai karakteristik kitin dan kitosan cangkang keong sawah serta manfaatnya sebagai anti bakteri terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kitosan

Kitosan merupakan senyawa turunan kitin senyawa penyusun rangka luar hewan berkaki banyak seperti kepiting dan udang. Ditemukan oleh C. Roughet pada tahun 1895 dengan cara memanaskan bersama kitin dengan larutan bersifat basa. Pada tahun 1940-an, penggunaan kitosan mulai menampakkan peningkatan. Kitosan mulai diaplikasikan secara khusus dalam berbagai bidang seperti makanan dan kesehatan yang dimulai pada perantaraan tahun 1980-1990 (Rismana, 2001). Secara kimiawi, kitin merupakan polimer β -(1,4)-2-asetamida-2 dioksi-D-glukosa. Salah satu turunan kitin adalah kitosan, suatu senyawa yang mempunyai rumus kimia β -(1,4)-2-amino-2 dioksi-D-glukosa. Kitosan didapatkan melalui proses deasetilasi dari kitin, dimana gugus asetil pada kitin oleh hidrogen diubah menjadi gugus amino dengan penambahan larutan basa kuat konsentrasi tinggi. Keberadaan gugus amida dalam kitin dan gugus amino dalam kitosan dapat menjadi adsorben yang mampu mengikat logam berat seperti Cd, Cu, Pb, Fe, Mn dan lainnya (Puspawati dan Simpen, 2010).



Gambar 1. Struktur kimia kitin (Dompeipen, 2017)

Apabila derajat deasetilasi kitin mencapai 70 % (tergantung dari jenis polimernya), dapat larut dalam larutan asam membentuk kitosan. Kelarutan ini terjadi dengan tahapan protonasi pada gugus fungsi $-NH_2$ pada posisi C-2 rantai D-Glukosamin dimana polisakarida diubah menjadi polielektrolit dalam suasana asam. Berat molekul kitosan yaitu 800 kDa. Berat molekul ini tergantung dari derajat deasetilasi yang dihasilkan pada saat ekstraksi. Semakin banyak gugus asetil yang hilang dari biopolimer asam, maka semakin kuat interaksi antar ion dan ikatan hidrogen dari kitosan (Younes dan Rinaudo, 2015). Spektrum infra merah dan gugus fungsi khas kitosan dapat dilihat pada Gambar 2 dan Tabel 1.



Gambar 2. Spektrum infra merah kitosan standar (Kadhim, 2016)

Tabel 1. Karakteristik gugus fungsi kitosan standar (Kadhim, 2016)

Bilangan gelombang (cm ⁻¹)	Gugus fungsi
3441.10	(O-H) group (-NH ₂) group
3259.70	N-H stretching
2927.94	Symmetric (CH ₃) stretching and Asymmetric (CH ₂) stretching
1662.64	(C=O) in the NHCOCH ₃ group (amide I band)
1554.63	Amide II band
1404.18	CH ₂ bending and CH ₃ deformation
1033.86	CO stretching
867.97	Ring stretching

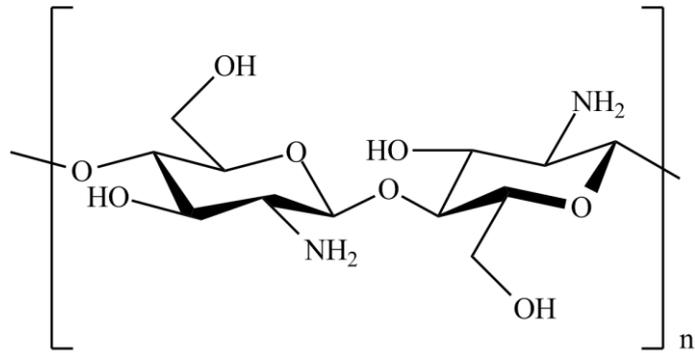
Kitin dan kitosan diketahui merupakan bahan alam terbesar kedua yang tersedia di alam setelah selulosa. Bahan ini dapat dihasilkan dari molusca bercangkang (*shellfish*), seperti kulit udang, rajungan, kerang, dan ketam. Sedangkan polimer selulosa dihasilkan dari tumbuh-tumbuhan (Kadhim, 2016). Beberapa sumber kitin dan kitosan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Sumber kitin dan kitosan (Hirano dkk., 1984)

Sumber	Jumlah (%)
Jamur	3-20
Tulang cumi-cumi	5-20
Kalajengking	30
Laba-laba	38
Kecoa	35
Kambing	37
Ulat sutra	44
Kepiting	69
Udang	70

dari Tabel 2, nampak bahwa sumber kitin dan kitosan yang paling melimpah ada pada udang-udangan dan kepiting.

Kitosan merupakan jenis polisakarida yang bersifat mudah terdegradasi secara alami atau secara biologis. Kitosan tidak beracun bagi manusia dan kitosan dapat bermanfaat sebagai obat penurun kolesterol dan sebagai penurun berat badan. Kitosan dapat diisolasi dari limbah kepiting yang melimpah di Indonesia, khususnya di Sulawesi Selatan (Hargono, 2008). Kitosan juga memiliki kemampuan reaksi yang cukup tinggi (alkilasi, asetilasi, karboksilasi) sehingga memberikan kemungkinan membentuk beragam senyawa turunan dengan sifat dan kegunaan yang baru dan beragam (Permadi, 1998).



Gambar 3. Struktur kimia kitosan (Dompeipen, 2017)

2.1.1 Isolasi Kitosan

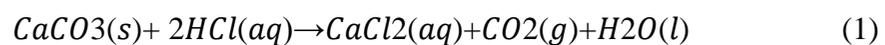
Menurut Nitsae dkk., (2018), Proses pembuatan kitosan melewati beberapa tahapan yaitu:

1. Deproteinasi

Deproteinasi bertujuan untuk memisahkan protein pada bahan dasar cangkang menggunakan larutan bersifat basa. Efektifitas prosesnya tergantung pada konsentrasi basa dan suhu yang digunakan karena semakin tinggi konsentrasi yang digunakan maka yang terjadi bukan lagi pemutusan ikatan hidrogen intermolekul antara kitin dan protein akan tetapi di duga terjadi pemutusan gugus asetil.

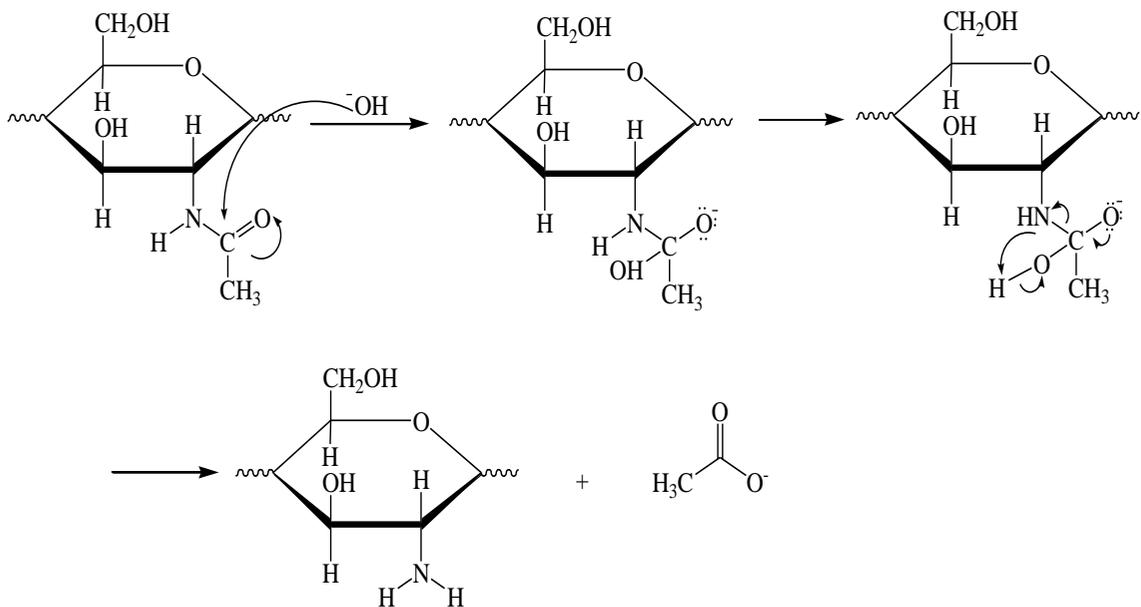
2. Demineralisasi

Proses demineralisasi bertujuan untuk mengurangi kandungan mineral yang terdapat dalam cangkang terutama senyawa CaCO_3 . Reaksi demineralisasi diperkirakan seperti pada Persamaan 1.



3. Deasetilasi

Deasetilasi bertujuan untuk menghilangkan gugus asetil ($-\text{CH}_3\text{COO}^-$) yang terdapat pada kitin menggunakan basa dengan konsentrasi tinggi dan waktu yang cukup lama sehingga tersisa lebih banyak gugus amina ($-\text{NH}_2$). Mekanisme reaksi terbentuknya kitosan dari kitin pada proses deasetilasi diperkirakan seperti pada Gambar 4.



Gambar 4. Proses isolasi kitin menjadi kitosan (Nitsae dkk., 2018)

2.1.2 Sifat dan Karakteristik Kitosan

Karakteristik kitosan diantaranya struktur yang tidak teratur, bentuknya kristalin atau semikristalin. Dapat juga berbentuk padatan amorf putih dengan struktur kristal tetap dari bentuk awal kitin murni. Kitosan mempunyai rantai yang lebih pendek dibanding kitin. Kelarutan kitosan dalam larutan asam serta viskositasnya tergantung dari derajat deasetilasi dan juga derajat degradasi polimer. Kitosan kering tidak mempunyai titik lebur. Bila kitosan disimpan dalam jangka waktu yang relatif lama pada suhu sekitar $100\text{ }^\circ\text{F}$ maka sifat keseluruhan

dan viskositasnya akan berubah. Bila kitosan disimpan lama dalam keadaan terbuka maka akan terjadi dekomposisi warna kitosan menjadi kekuningan dan viskositasnya akan berkurang (Harianingsih, 2010).

Kemurnian kitosan dapat dilihat dari derajat deasetilasinya. Semakin tinggi derajat deasetilasi, jumlah gugus amina (NH_2) pada rantai molekul kitosan akan semakin tinggi sehingga kitosan semakin murni. Pengujian standar mutu kitosan perlu dilakukan untuk menentukan kualitas kitosan yang dikomersialisasi (SNI, 2013). Karakteristik kitin dan kitosan dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Karakteristik kitin dan kitosan (SNI, 2013)

N0.	Jenis uji	Satuan	Peryaratan Kitosan	Persyaratan kitin
1	Bentuk partikel	-	Serbuk	Serbuk
2	Warna	-	Coklat muda-Putih	Coklat muda-putih
3	Zat pengotor	-	Negatif	Negatif
4	Derajat deasetilasi	%	Minimal 75	10-65
5	pH	-	7-8	6-8
6	Kadar abu	%	Maksimal 5	maksimal 5
7	Kadar air	%	Maksimal 12	maksimal 12
8	Kadar N-total	%	Maksimal 7	maksimal 5

Kitosan tidak larut dalam air namun larut dalam asam, memiliki viskositas cukup tinggi ketika dilarutkan, sebagian besar reaksi karakteristik kitosan merupakan reaksi karakteristik kitin. Adapun berbagai solvent yang digunakan umumnya tidak beracun untuk aplikasi dalam bidang makanan. *Solvent* yang digunakan untuk melarutkan kitosan adalah asam format/air, asam asetat/air, asam laktat/air dan asam glutamat/air (Harianingsih, 2010).

Kitosan juga mempunyai beberapa sifat biologis. Menurut Sugita (2009) sifat tersebut antara lain.

1. Bersifat fungistatik, spermisidal, antitumor dan antikolesterol.
2. Dapat berikatan dengan sel mikroba secara agresif.
3. Bersifat biokompatibel yang merupakan polimer alami dan tidak mempunyai efek samping, mudah diuraikan oleh mikroba, tidak beracun dan tidak dapat dicerna.

2.1.3 Kitosan Sebagai Antibakteri

Kitosan memiliki sifat dan mekanisme penghambatan, sehingga mampu digunakan sebagai antibakteri. Antibakteri adalah bahan yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Kitosan akan berikatan dengan glutamat pada membran sel bakteri. Selain itu, kitosan akan berikatan dengan fosfolipid membran terutama fosfatidil kolin yang bisa meningkatkan permeabilitas inner membran. Naiknya permeabilitas inner membran akan memudahkan cairan sel untuk keluar. Hal ini mengakibatkan sitoplasma mengalami lisis sehingga keluar membawa metabolit lainnya (Trisnawati dkk., 2013).

Menurut Yulisma dkk., (2012), kitosan memiliki gugus amino kationik (NH_3^+) yang mampu berikatan kuat dengan permukaan sel mikroba yang memiliki muatan negatif, sehingga mengakibatkan deporalisasi membran seluler mikroba sebagai akibat terganggunya keutuhan dinding sel. Ikatan gugus amino dengan permukaan sel mikroba dapat menyebabkan kematian bagi mikroba.

Mekanisme kerja kitosan secara spesifik sebagai antibakteri adalah sifat afinitas yang dimiliki oleh kitosan yang sangat kuat dengan DNA mikroba sehingga dapat berikatan dengan DNA yang kemudian mengganggu mRNA dan sintesa protein. Sifat afinitas antimikroba dari kitosan dalam melawan bakteri atau mikroorganisme tergantung dari berat molekul dan derajat deasetilasi. Berat

molekul dan derajat deasetilasi yang lebih besar menunjukkan antimikroba yang lebih besar. Kitosan memiliki gugus fungsional amina (NH₂) yang bermuatan positif yang sangat reaktif, sehingga mampu berikatan dengan dinding sel bakteri yang bermuatan negatif. Ikatan ini terjadi pada situs elektronegatif di permukaan dinding sel bakteri. Selain itu, karena gugus amina juga mempunyai pasangan elektron bebas, maka gugus ini dapat menarik mineral Ca²⁺ yang terdapat pada dinding sel bakteri dengan membentuk ikatan kovalen koordinasi. Bakteri Gram negatif dengan lipopolisakarida dalam lapisan luarnya memiliki kutub negatif yang sangat sensitif terhadap kitosan. Dengan demikian, kitosan dapat digunakan sebagai bahan antibakteri atau pengawet pada berbagai produk pangan karena aman, tidak berbahaya dan harganya relatif murah (Killay, 2013).

2.2 Keong Sawah (*Pila ampullacea*)

2.2.1 Klasifikasi Keong Sawah (*Pila ampullacea*)

Menurut Oktasari (2014) klasifikasi keong sawah adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Mollusca
Kelas	: Gastropoda
Superfamili	: Ampullariodidae
Famili	: Ampullariidae
Ordo	: Ampullariini
Genus	: <i>Pila</i>
Spesies	: <i>Pila ampullacea</i>

Keong sawah (Gambar 5) adalah sejenis siput air tawar dan mudah dijumpai di sawah, sungai dan tanah berlumpur lainnya. Bentuk keong sawah

menyerupai siput keong mas (murbai), tetapi keong sawah memiliki warna cangkang hijau pekat sampai hitam. Jumlah keong sawah paling banyak berada di sekitar parit sawah karena dianggap menjadi hama bagi tanaman, sehingga para petani biasanya mengambil dan membasmi keong sawah. Di beberapa daerah, daging keong sawah dapat diolah sebagai makanan (Regar dkk., 2018).



Gambar 5. Keong Sawah (*Pila ampullacea*) (Oktasari, 2014)

2.2.2 Nutrisi Keong Sawah (*Pila ampullacea*)

Keong sawah adalah salah satu jenis keong air yang bertubuh besar, *Gastropoda* air yang termasuk dalam keluarga *Ampullariidae*. Hewan ini banyak dikonsumsi oleh masyarakat yang mendiami benua Afrika barat dan juga Eropa (Obande dkk., 2013). Keong sawah memiliki nilai gizi yang baik karena mengandung protein yang cukup tinggi. Kandungan gizi keong sawah antara lain protein 15 %, lemak 2,4 %, serat 6,09 %, kadar abu 24 %. Kandungan gizi keong dipengaruhi oleh usia dan habitat keong (kondisi tanah dan asupan makanan) (Oktasari, 2014).

Menurut Hartono (2012) manfaat dari keong sawah diantaranya adalah:

1. Keong sawah kaya akan protein, tetapi rendah lemak sehingga dapat dijadikan sebagai alternatif makanan tinggi protein yang rendah lemak. Protein menunjang keberadaan setiap sel tubuh dan juga berperan dalam proses kekebalan tubuh. Konsumsi protein hewani dalam makanan sehari-hari diperlukan oleh tubuh di samping protein nabati.
2. Lemak yang terdapat dalam keong merupakan asam lemak esensial dalam bentuk asam linoleat dan asam linolenat. Sebuah studi di Brazil menunjukkan bahwa lemak dalam keong sawah merupakan asam lemak tidak jenuh yang dapat menurunkan kadar kolesterol darah.
3. Kandungan vitamin pada keong sawah cukup tinggi dengan dominasi vitamin A, vitamin E, niasin dan folat. Vitamin A berperan dalam pembentukan indra penglihatan yang baik, menjaga kesehatan kulit dan imunitas tubuh. Niasin atau vitamin B3 berperan penting dalam metabolisme karbohidrat, menjaga kadar gula darah, tekanan darah tinggi, penyembuhan migrain, dan vertigo. Vitamin E berperan dalam menjaga kesehatan berbagai jaringan di dalam tubuh, mulai dari jaringan kulit, mata, sel darah merah hingga hati.
4. Folat berfungsi membantu pembentukan sel darah merah, mencegah anemia, dan sebagai bahan pembentukan bahan genetik sel.
5. Mineral merupakan zat yang berperan penting pada tubuh manusia untuk pengaturan kerja enzim-enzim, pemeliharaan keseimbangan asam-basa, membantu pembentukan ikatan yang memerlukan mineral seperti pembentukan hemoglobin. Kandungan mineral yang utama pada keong sawah berupa kalsium, zat besi, magnesium, kalium dan fosfor.

2.3 Bakteri

Bakteri merupakan mikroorganisme bersel tunggal atau uniseluler, tidak mempunyai klorofil, berkembangbiak dengan pembelahan sel atau biner. Karena tidak mempunyai klorofil, bakteri hidup sebagai jasad yang saprofitik ataupun sebagai jasad parasitik. Tempat hidupnya tersebar dimana-mana, yaitu di udara, tanah, air, pada bahan-bahan, tanaman ataupun pada tubuh manusia atau hewan (Murray dkk., 1998). Menurut Samayanake (2002), klasifikasi bakteri didasarkan pada beberapa golongan seperti pada Tabel 4.

Tabel 4. Penggolongan Bakteri (Samayanake, 2002)

Penggolongan Umum	Penggolongan Khusus
Bakteri Patogen	Bakteri Gram Negatif
	Bakteri Gram Positif
	Bakteri tanpa dinding sel
Berdasarkan Genetika	Komposisi basa DNA
	Homologi sekuens DNA dan RNA Ribosom
	Pola-pola metabolisme stabil yang dikontrol gen
	Polimer pada sel
	Struktur organel
Berdasarkan Ekspresi Fenotipe	Morfologi Sel
	Morfologi Koloni
	Sifat terhadap pewarnaan
	Reaksi pertumbuhan
	Sifat pertumbuhan
Berdasarkan Bentuk Sel	Bentuk bulat (coccus)
	Bentuk batang
	bentuk spiral
	bentuk vibrio
Terhadap Sifat Pewarnaan	Pewarnaan sederhana
	Pewarnaan diferensial
	Pewarnaan khusus
Berdasarkan Sifat Pertumbuhan	Aerob
	Anaerob
	Mikroaerofilik

Bakteri, seperti halnya semua makhluk hidup, membutuhkan makanan untuk dapat bermetabolisme dan untuk dapat melakukan pembelahan sel, dan tumbuh secara optimal di lingkungan yang menyediakan kebutuhan-kebutuhannya. Secara kimiawi, bakteri terbentuk oleh unsur-unsur polisakarida, protein, lipid, asam nukleat dan peptidoglikan yang keseluruhannya harus dibentuk untuk mencapai pertumbuhan yang baik. Bakteri melakukan reproduksi melalui suatu proses yang disebut pembelahan biner, dimana sel induk membelah menjadi dua sel dan seterusnya. Hal ini menyebabkan laju pertumbuhan bakteri mengikuti pertumbuhan logaritme, yaitu satu bakteri akan menghasilkan 16 bakteri dalam 4 generasi. Rata-rata waktu pembelahan bakteri bisa sangat bervariasi (misalnya 20 menit untuk *E. coli*, 20 jam untuk *Mycobacterium tuberculosis*), makin pendek waktu pembelahan, makin cepat laju multiplikasinya. Faktor lain yang mempengaruhi waktu pembelahan antara lain adalah jumlah nutrient, suhu dan pH lingkungan (Samaranayake, 2002).

Menurut Bagg dkk (2002) suhu optimal sangat dibutuhkan untuk kerja enzim bakteri yang efektif, meskipun bakteri dapat tumbuh pada rentang suhu yang sangat lebar. Berdasarkan kemampuan bakteri pada suhu lingkungan, bakteri dapat diklasifikasikan sebagai berikut

1. bakteri mesofil, yaitu bakteri yang dapat tumbuh baik pada suhu 25–40 °C. Termasuk dalam golongan ini adalah bakteri-bakteri yang penting secara medis (yang tumbuh pada temperatur badan).
2. bakteri termofil, bakteri yang dapat tumbuh baik pada suhu 55 – 80 °C (*Thermus aquaticus* misalnya, tumbuh pada daerah bersuhu tinggi, dan enzimnya seperti Taq-polimerase, adalah enzim yang tahan panas).

3. bakteri psikorofil, yang tumbuh pada suhu 20 °C.

Konsentrasi ion hidrogen (pH) pada lingkungannya seharusnya antara pH 7,2-7,4 (misalnya pH fisiologis) untuk pertumbuhan bakteri yang optimal. Meskipun demikian, beberapa bakteri (misalnya *Lactobacillus* sp.) dapat mempengaruhi lingkungan ekologisnya, misalnya menyebabkan proses karies gigi dimana pH dapat diturunkan sampai 5,0 (Bagg dkk., 2002).

2.3.1 Media Pertumbuhan Bakteri

Media pertumbuhan bakteri adalah suatu bahan yang terdiri atas campuran nutrient yang digunakan mikroorganisme untuk tumbuh. Media pertumbuhan juga bisa digunakan untuk mengisolasi mikroorganisme, identifikasi dan membuat kultur murni. Komposisi media pertumbuhan dapat dimanipulasi untuk tujuan masing-masing pembuatan suatu media. Media adalah suatu bahan yang terdiri dari campuran nutrient yang berguna untuk membiakkan mikroba. Dengan menggunakan media, dapat dilakukan isolasi, perbanyakan, pengujian sifat fisiologis dan perhitungan jumlah mikroba. Menurut Yodong dkk, (2017) beberapa media yang secara umum digunakan dalam mikrobiologi adalah sebagai berikut:

1. ***Lactose Broth***, media yang digunakan untuk mendeteksi kehadiran koliform dalam air, makanan, dan produk susu.
2. **EMBA (*Eosin Methylene Blue Agar*)**, mempunyai keistimewaan mengandung laktosa dan berfungsi untuk memilah mikroba yang memfermentasikan laktosa seperti *S. Aureus*, *P. Aerugenosa* dan *Salmonella*. Mikroba yang memfermentasikan laktosa menghasilkan koloni dengan inti

berwarna gelap dengan kilap logam. Sedangkan mikroba lain yang dapat tumbuh koloninya tidak berwarna.

3. **Nutrient Agar**, yaitu medium untuk uji air dan produk dairy. NA juga digunakan untuk pertumbuhan mayoritas dari mikroorganisme yang tidak selektif, dalam artian mikroorganisme heterotrof. Media ini merupakan media sederhana yang dibuat dari ekstrak *beef*, pepton, dan agar.
4. **Nutrient Broth**, merupakan media untuk mikroorganisme yang berbentuk cair. Intinya sama dengan nutrient agar.
5. **Trypticase Soy Broth (TSB)**, adalah media yang diperkaya untuk tujuan umum, untuk isolasi, dan penumbuhan bermacam mikroorganisme. Media ini banyak digunakan untuk isolasi bakteri dari spesimen Laboratorium dan akan mendukung pertumbuhan mayoritas bakteri patogen.
6. **Plate Count Agar (PCA)**, adalah medium yang digunakan untuk mikroba aerobik dengan inokulasi di atas permukaan. Media PCA ini baik untuk pertumbuhan total mikroba (semua jenis mikroba) karena didalamnya mengandung komposisi casein enzymic hydrosilate yang menyediakan asam amino dan substansi nitrogen kompleks lainnya serta ekstrak *yeast* mensuplai vitamin B kompleks.
7. **Potato Dextose Agar (PDA)**, digunakan untuk menumbuhkan atau mengidentifikasi ragi dan kapang. Dapat juga digunakan untuk enumerasi ragi dan kapang dalam suatu sampel atau produk makanan. PDA cocok untuk pertumbuhan jamur. PDA mengandung sumber karbohidrat dalam jumlah cukup yaitu terdiri dari 20% ekstrak kentang dan 2% glukosa sehingga baik

untuk pertumbuhan kapang dan khamir tetapi kurang baik untuk pertumbuhan bakteri.

2.3.2 Metode Pengujian Antibakteri

Kemampuan senyawa dalam menghambat pertumbuhan bakteri tertentu dilakukan secara *invitro* (Jawetz dkk., 2008). Adapun cara pengujian antibakteri adalah sebagai berikut.

1. Metode Difusi

Metode ini paling sering digunakan dan juga dikenal dengan istilah metode Kirby-Bauer. Prinsip kerja metode ini adalah cawan petri yang berisi media agar yang telah dimasukkan bakteri standar diatas permukaannya, kemudian kertas cakram yang telah direndam dalam senyawa antibakteri yang telah diketahui konsentrasinya diletakkan di atas permukaan agar yang sudah memadat. Selama inkubasi, senyawa antibakteri akan berdifusi dari kertas cakram ke media agar. Apabila senyawa antibakteri efektif maka zona hambat akan terbentuk disekitar cakram setelah inkubasi, diameter dari zona hambat tersebut kemudian diukur (Pratiwi, 2008). Menurut Susanto dkk., (2012), klasifikasi respon hambatan pertumbuhan disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Klasifikasi respon hambatan pertumbuhan bakteri (Susanto dkk., 2012)

Diameter Zona Hambat	Respon Hambatan
≥ 21 mm	Sangat kuat
11-20 mm	Kuat
6-10 mm	Sedang
< 5 mm	Lemah

2. Metode Dilusi

a. Metode Dilusi Cair (*Broth Dilution Test*)

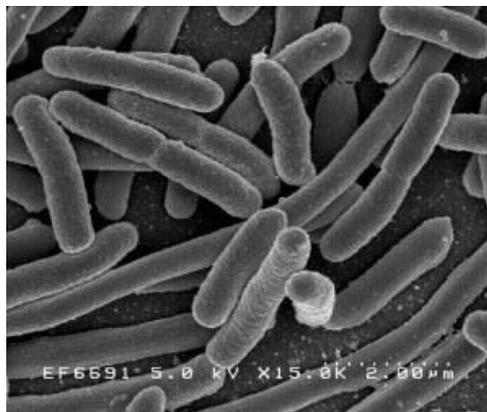
Metode ini bertujuan untuk mengukur kadar hambat minimum (KHM) dan kadar bunuh minimum (KBM). Proses ini dilakukan dengan membuat seri pengenceran agen bakteri pada media cair yang ditambahkan dengan bakteri uji. KHM dapat ditentukan dari kadar terkecil agen antibakteri yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan mikroba uji. Selanjutnya dikultur ulang pada media cair tanpa penambahan media uji ataupun agen antibakteri dan diinkubasi selama 18-24 jam. Daerah bening pada media cair setelah diinkubasi menunjukkan KBM (Pratiwi, 2008).

b. Metode Dilusi Padat (*Solid Dilution Test*)

Metode ini mirip dengan metode dilusi cair, perbedaannya untuk metode ini menggunakan media padat. Keuntungan dari metode ini adalah untuk menguji beberapa bakteri uji dapat hanya dengan menggunakan satu konsentrasi agen antibakteri (Pratiwi, 2008).

2.3.3 Bakteri Uji

2.3.3.1 Bakteri *Escherichia Coli*



Gambar 6. Bakteri *E. coli* (Escherich, 1885)

Menurut Songer dan Post (2005), klasifikasi bakteri *E. coli* adalah sebagai berikut.

Kingdom : Bacteria
Filum : Proteobacteria
Kelas : Gamma Proteobacteria
Ordo : Enterobacteriales
Famili : Enterobacteriaceae
Genus : *Escherichia*
Spesies : *Escherichia coli*

Bakteri *Escherichia coli* ditemukan pada tahun 1885 oleh Theodor Escherich dan diberi nama sesuai dengan nama penemunya. *Escherichia coli* merupakan bakteri Gram negatif enterik (*Enterobacteriaceae*) yaitu kuman flora normal yang ditemukan dalam usus besar manusia. Bakteri ini bersifat patogen apabila berada diluar usus, yaitu lokasi normal tempatnya berada dan tempat lain yang jarang ditinggali oleh bakteri ini (Ilmiawati dkk., 2017). Bakteri ini berbentuk batang pendek lurus dengan ukuran 1,1-1,5 μm , tidak memiliki kapsul atau spora, bersifat anaerob fakultatif dan mudah tumbuh pada medium nutrient sederhana (Pelczar, dkk, 2008). Bakteri *E. coli* adalah bakteri kolon (Coliforms) yang sering digunakan sebagai indeks pencemaran air. Sehingga air yang banyak mengandung bakteri ini dikatakan tercemar (Sumarsih, 2003).

Media yang digunakan untuk mendeteksi bakteri Coliform di dalam air, makanan, dan produk lainnya adalah Media Brilian Green Lactose Broth. Media ini dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan menggiatkan pertumbuhan bakteri Gram negatif. Ada atau tidaknya bakteri Gram negatif

ditandai dengan terbentuknya asam dan gas yang disebabkan karena fermentasi laktosa oleh bakteri dari golongan coli (Yodong dkk., 2017). *E. coli* tidak dapat dibunuh dengan pendinginan maupun pembekuan. Bakteri ini hanya bisa dibunuh oleh antibiotik, sinar *Ultraviolet* (UV), atau suhu tinggi >100 °C. Suhu tinggi akan merusak protein dalam sel dan membuatnya tidak dapat hidup kembali. *E. coli* yang tidak direkayasa genetika umumnya tidak dapat hidup jika ada antibiotik seperti *amphicillin* dan kloramfenikol (Girard dkk., 2003).

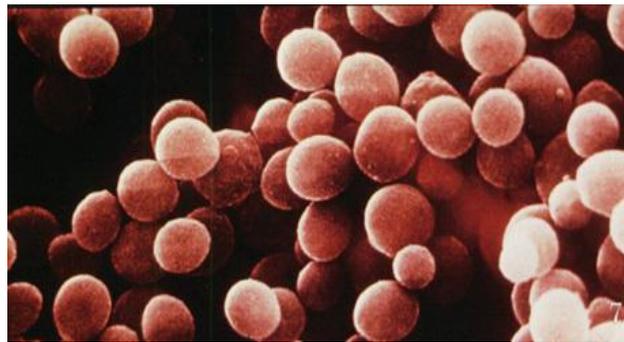
Kebanyakan *E. coli* tidak berbahaya, tetapi beberapa seperti *E. coli* tipe O157:H7 dapat mengakibatkan keracunan makanan yang serius pada manusia yaitu diare berdarah karena eksotoksin yang dihasilkan bernama verotoksin. Toksin ini bekerja dengan cara menghilangkan suatu basa adenin dari unit 285 rRNA sehingga menghentikan sintesis protein. Sumber bakteri ini contohnya adalah daging yang belum masak, seperti daging *hamburger* yang belum matang (Zhu dkk., 1994). *E. coli* tipe O157:H7 ini dapat bertahan hidup pada suhu yang sangat rendah dan asam. Salah satu contoh kasus adalah bakteri *E. coli* yang pernah mewabah di Jerman pada tahun 2013-2014, belum diketahui jenisnya namun diduga adalah tipe O157:H7. Selain di usus besar, bakteri ini banyak terdapat di alam, sehingga memasak makanan dan menjaga kebersihan merupakan upaya pencegahan dampak buruk dari *E. coli* (Kaper dkk., 2004).

2.3.3.2 Bakteri *Staphylococcus aureus*

Menurut Yuswari (2006) *S. aureus* (Gambar 7) dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom :Bacteria
Filum :Firmicutes

Kelas :Bacilli
Ordo :Bacillales
Family :Staphylococcaceae
Genus :*Staphylococcus*
Spesies :*Staphylococcus aureus*



Gambar 7. Bakteri *S. aureus* dilihat dari mikroskop elektron (Todar, 2002)

S. aureus merupakan bakteri Gram positif berbentuk bulat berdiameter 0,7-1,2 μm , tersusun dalam kelompok yang tidak teratur seperti buah anggur, fakultatif anaerob, tidak membentuk spora, dan tidak bergerak. Bakteri ini tumbuh pada suhu umum 37 °C, tetapi membentuk pigmen paling baik pada suhu kamar (20-25 °C). Koloni pada perbenihan padat berwarna abu-abu sampai kuning keemasan, berbentuk bundar, halus, menonjol, dan berkilau (Jawetz dkk., 2008).

S. aureus adalah bakteri halofilik dan termasuk patogen yang tahan larutan garam hingga 20%. Bakteri ini memproduksi racun yang sulit dihancurkan dengan pemanasan, sehingga walaupun pemanasan yang dilakukan dapat membunuh bakteri, tetapi racun tetap bersifat membahayakan dan dapat menyebabkan keracunan (Febriyanti, 2015). Enterotoksin *S.aureus* berperan dalam menyebabkan sindrom yang disebut keracunan makanan stafilokokus. Keracunan ini terjadi bila makanan terkontaminasi dengan strain *S. aureus* penghasil enterotoksin. Gejala

klinis keracunan makanan yang disebabkan oleh bakteri tersebut adalah mual, nyeri perut, diare, dan tidak disertai demam (Widyaningsih, 2016). Disebut enterotoksin karena menimbulkan radang lambung dan usus (gastroenteritis). Manusia yang sehat dan normal akan menderita sakit jika memakan kira-kira 30 gr atau ml makanan yang mengandung 100-200 μg toksin yang diproduksi oleh 10^6 - 10^7 sel per gram atau ml. Bahan pangan akan menjadi toksik bila mikroorganisme yang dikandungnya mencapai jumlah 10^6 - 10^{10} *S. aureus* per gram. Dalam kasus keracunan makanan *S. aureus* mensekresikan 2 (dua) jenis toksin yang mempunyai aktivitas sebagai super antigen yaitu enterotoksin dan *Toxic Shock Syndrome* yang bersifat *heat stable* sehingga tidak rusak oleh pemanasan (Yuswari, 2006).

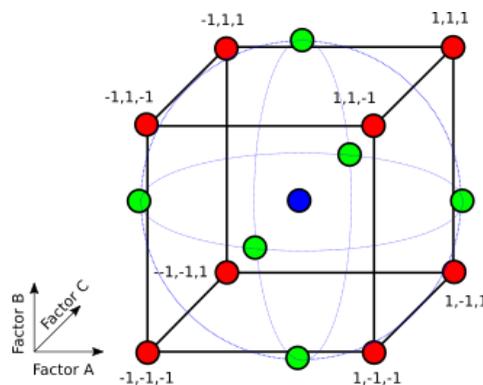
2.4 Metode Respon Permukaan (*Response Surface Methodology*)

Menurut Montgomery (1991), metode respon permukaan adalah suatu metode yang menggabungkan teknik matematika dan statistika dengan tujuan membuat model dan menganalisis suatu respon yang dipengaruhi oleh beberapa variabel bebas atau faktor, dengan tujuan mengoptimalkan respon tersebut. Ide dasar metode respon permukaan adalah memanfaatkan desain eksperimen dengan bantuan statistika untuk mencari nilai optimal dari suatu respon. Keuntungan metode ini adalah dapat mempermudah pencarian wilayah optimum. Bila tidak menggunakan metode tersebut, perlu dilakukan eksperimen berulang ulang dimana eksperimen tersebut membutuhkan biaya dan waktu yang banyak sehingga tidak efektif dan efisien (Syafaat, 2015). Menurut Box dan Draper (1987) , metode respon permukaan memiliki kegunaan antara lain:

1. Menunjukkan bagaimana variabel respon y dipengaruhi oleh variabel x di wilayah tertentu.

2. Menentukan pengaruh variabel bebas yang paling tepat dimana akan memberikan hasil yang memenuhi spesifikasi dari respon yang berupa hasil, warna, tekstur dan sebagainya.
3. Mengeksplorasi ruang dari variabel bebas x untuk mendapatkan hasil maksimum dan menentukan sifat dasar dari nilai maksimum

Terdapat beberapa hal yang perlu diperhatikan saat menggunakan metode respon permukaan. Hal tersebut adalah melihat apakah bentuk persamaannya merupakan fungsi berorde satu atau fungsi berorde dua. Untuk fungsi berorde satu, maka rancangannya menggunakan *Box-behnken design* sementara untuk fungsi berorde dua menggunakan *Central Composite Design (CCD)* (Syafaat, 2015). CCD dapat divisualisasikan sebagai bentuk kubus dengan titik-titik optimum pada setiap sudut kubus sebagai titik minimum dan maksimum. Kubus yang terbentuk pada proses CCD, sama seperti diagram kartesius. CCD ini lazim digunakan untuk mencari nilai minimum, maksimum, dan optimal yang terletak dari suatu kubus dalam suatu titik. Titik yang terletak di setiap bidang dan satu titik yang berada di tengah kubus menjadi titik nilai respon minimum, maksimum, dan optimal (Mulyana dan Fadhillah, 2019).



Gambar 8. Visualisasi model CCD (Mulyana dan Fadhillah, 2019)