

**ISOLASI, KARAKTERISASI KITIN DAN KITOSAN DARI CANGKANG
KERANG HIJAU (*Perna viridis*) SERTA APLIKASINYA
SEBAGAI ANTIBAKTERI SECARA *INVITRO***

IZZAH MAURYZA H. KORDI K.

H311 16 009



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

**ISOLASI, KARAKTERISASI KITIN DAN KITOSAN DARI CANGKANG
KERANG HIJAU (*Perna viridis*) SERTA APLIKASINYA
SEBAGAI ANTIBAKTERI SECARA *INVITRO***

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

Oleh:

IZZAH MAURYZA H. KORDI K.

H311 16 009



MAKASSAR

2021

LEMBAR PENGESAHAN (TUGAS AKHIR)

**ISOLASI, KARAKTERISASI KITIN DAN KITOSAN DARI CANGKANG
KERANG HIJAU (*Perna viridis*) SERTA APLIKASINYA
SEBAGAI ANTIBAKTERI SECARA *INVITRO***

Disusun dan diajukan oleh:

**IZZAH MAURYZA H. KORDI K.
H311 16 009**

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 12 Agustus 2021
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

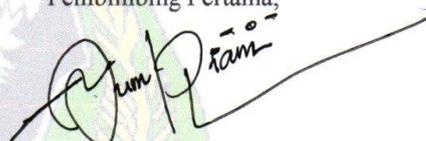
Menyetujui,

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pertama,



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



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 : Izzah Mauryza H. Kordi K.
NIM : H311 16 009
Program Studi : Kimia
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa Skripsi dengan judul

ISOLASI, KARAKTERISASI KITIN DAN KITOSAN DARI CANGKANG
KERANG HIJAU (*Perna viridis*) 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, 12 Agustus 2021

Menyatakan

Izzah Mauryza H. Kordi K.

PRAKATA

Assalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Alhamdulillah rabbil 'alamin, segala puji bagi Allah *Subhana Wa Ta'ala* tuhan semesta alam yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang, telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya. Shalawat serta salam senantiasa tercurahkan kepada junjungan Nabi Agung Muhammad SAW yang selalu kita nantikan syafa'atnya di akhirat nanti.

Penulis mengucapkan syukur kepada Allah *Subhana Wa Ta'ala* atas limpahan nikmat kesehatan, baik sehat fisik maupun akal pikiran, sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi yang berjudul **Isolasi, Karakterisasi Kitin dan Kitosan dari Cangkang Kerang Hijau (*Perna viridis*) dalam Aplikasinya sebagai Antibakteri Secara *Invitro*** disusun sebagai salah satu persyaratan akademik yang harus dipenuhi untuk menyelesaikan program strata satu (S1) pada Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.

Banyak halangan serta hambatan yang penulis lewati selama menyelesaikan skripsi ini. Namun dengan bantuan, dukungan, doa, semangat dan kerja sama dari berbagai pihak sehingga akhirnya skripsi ini dapat diselesaikan. Izinkan penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang tulus kepada Ibu **Dr. Rugaiyah A Arfah, M.Si** dan Ibu **Dr. Nur Umriani Permatasari, M.Si** selaku pembimbing utama dan pertama, yang senantiasa memberikan pengarahan, bantuan, perhatian, dan motivasi selama proses penyelesaian skripsi ini.

Limpahan rasa hormat dan bakti serta doa yang tulus, penulis persembahkan kepada orang tua Ayah dan Ibu tercinta, **M. Ghufan H. Kordi K.**

dan **Syarifah** yang hingga detik ini tidak pernah berhenti mendoakan dan mendukung segalanya. Saudara penulis **Ryza Mauryz H. Kordi K.** yang selalu memberi dukungan dan semangat. Keberhasilan penulis sampai pada tahap penulisan skripsi ini tak lepas dari bantuan, baik materil maupun spiritual dari orang-orang di lingkungan penulis. Karena itu penulis menghaturkan terima kasih kepada :

1. Ibu **Dr. Hj. Nursiah La Nafie, M.Sc** yang juga selaku (ketua) dan Bapak **Dr. Syahrudin Kasim, M.Si** (sekretaris), sebagai penguji yang telah meluangkan waktunya untuk memberi saran dan masukan yang sangat berharga.
2. Analis laboratorium kak Anti, kak Fibi, pak Sugeng, ibu Tini, kak Linda, pak Iqbal dan kak Akbar, terkhusus untuk kak akbar terima kasih atas bantuan dan kritikan serta sarannya pada saat penelitian sehingga sangat membantu menyelesaikan penelitian ini.
3. Seluruh **Dosen dan Staff Akademik Unhas** yang membimbing dan mengarahkan penulis hingga ketahap ini.
4. Teman-teman **Kromofor16** yang selama ini telah berjuang melewati masa studi dan yang masih berusaha untuk menyelesaikan studi di departemen Kimia FMIPA Unhas.
5. Sahabat-sahabat terbaik penulis, **Strong Woman** (Bee, Dian, Elya, Mega, Ana, Mayumi dan Mage), **KKN Jaisin Squad 102**, yang selalu menemani dan memberikan dukungan sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini.
6. Teman seperjuangan dalam menyelesaikan penelitian ini, saudara **Miftahuddin.**

7. Sahabat tercinta yang selalu memberi dukungan serta doa dimanapun berada saudari Ridzky Gusmiarni R.
8. Anak-anak *Silent Partner* yang selalu memberi doa dan dukungan: Rosmala, Eka, Hikma, Indah dan Dea.
9. Teman-teman sesama Peneliti Biokimia Departemen Kimia FMIPA Unhas yang selalu berbagai saran dan pendapat, saling menyemangati dan memotivasi selama berjalannya penelitian ini.
10. Warga serta Alumni KMK FMIPA UNHAS dan KMFMIPA UNHAS
11. Seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu dalam kesempatan ini.

Semoga segala bentuk bantuan yaitu doa, saran, motivasi dan pengorbanan yang telah diberikan kepada penulis dapat bernilai ibadah dan diganjar pahala disisi Allah *Subhallahu wa Ta'ala*, Aamiin

Penulis sadar akan segala kekurangan dalam penulisan skripsi ini, maka penulis sangat menghargai bila ada kritik dan saran demi penyempurnaan isi skripsi ini. Akhirnya penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi semua pihak yang membaca maupun bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Wassalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Makassar, Juli 2021

Penulis

ABSTRAK

Pada penelitian ini dilakukan isolasi kitin dari cangkang kerang hijau (*Perna viridis*). Kitin diperoleh melalui 3 tahap proses isolasi yaitu deproteinasi untuk menghilangkan protein, demineralisasi untuk menghilangkan mineral dan depigmentasi untuk menghilangkan zat warna pada kitin, sedangkan proses pembuatan kitosan dengan cara deasetilasi kitin atau penghilangan gugus asetil pada kitin. Kitosan memiliki banyak manfaat, salah satunya dapat digunakan sebagai antibakteri terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Pada penelitian ini telah dilakukan optimasi proses deproteinasi dan demineralisasi kitin untuk memperoleh kitin dengan kondisi optimum. Proses deproteinasi menggunakan pelarut NaOH dengan variasi konsentrasi 1-5 %, proses demineralisasi menggunakan HCl dengan variasi konsentrasi 0,5-1,5 M, proses depigmentasi menggunakan NaOCl 0,5 %, proses penghilangan gugus asetil pada kitin menggunakan NaOH 60 %. Karakterisasi kitin dan kitosan dilakukan dengan menghitung kadar air, kadar abu, kadar protein dan derajat deasetilasi. Kadar air pada kitin sebesar 0,38 % dan kitosan 0,30 %. Kadar abu pada kitin sebesar 0,74 % dan kitosan sebesar 0,45 %. Kadar protein pada kitin sebesar 1,04 % dan kitosan sebesar 0,46 %. Derajat deasetilasi yang diperoleh pada kitin yaitu 68,77 % dan pada kitosan sebesar 84,80 %. Hasil uji konsentrasi kitosan terhadap aktivitas antibakteri *E. coli* dan *S. aureus* didapatkan zona hambat terbesar yaitu pada konsentrasi kitosan 1 % selama 72 jam.

Kata kunci: cangkang kerang hijau, *E.coli*, kitin, kitosan, *S. aureus*

ABSTRACT

In this research, chitin was isolated from the shells of green mussels (Perna viridis). Chitin is obtained through 3 stages of the isolation process, deproteination to remove protein, demineralization to remove minerals, and depigmentation to remove the dye in chitin, while the process of making chitosan is by deacetylation of chitin or removal of acetyl groups in chitin. Chitosan has many benefits, one of which can be used as an antibacterial against E. coli and S. aureus bacteria. In this study, optimization of the deproteination and demineralization of chitin was carried out to obtain chitin with optimum conditions. The deproteination process uses NaOH solvent with a concentration variation of 1-5%, the demineralization process uses HCl with a concentration variation of 0.5-1.5 M, the depigmentation process uses 0.5% NaOCl, the acetyl group removal process in chitin uses 60% NaOH. The characterization of chitin and chitosan was carried out by calculating the moisture content, ash content, protein content and degree of deacetylation. The water content in chitin is 0.38% and chitosan is 0.30%. Ash content in chitin is 0.74% and chitosan is 0.45%. The protein content of chitin is 1.04% and chitosan is 0.46%. The degree of deacetylation obtained in chitin is 68.77% and in chitosan is 84.80%. The results of the test of chitosan concentration on the antibacterial activity of E. coli and S. aureus obtained the largest inhibition zone at 1% chitosan concentration for 72 hours.

Keywords: *chitin, chitosan, E.coli, green mussel shell, S. aureus*

DAFTAR ISI

| | halaman |
|---|----------------|
| PRAKATA | v |
| ABSTRAK | viii |
| ABSTARCT | ix |
| DAFTAR ISI | x |
| DAFTAR TABEL | xiii |
| DAFTAR GAMBAR | xiv |
| DAFTAR SIMBOL DAN ISTILAH | xv |
| DAFTAR LAMPIRAN..... | xvi |
| BAB I PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah | 4 |
| 1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian..... | 5 |
| 1.3.1 Maksud Penelitian | 5 |
| 1.3.2 Tujuan Penelitian..... | 5 |
| 1.4 Manfaat Penelitian..... | 5 |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA | 6 |
| 2.1 Kerang Hijau (<i>Perna viridis</i>) | 6 |
| 2.2 Kitin | 8 |
| 2.3 Kitosan | 10 |
| 2.4 Pemanfaatan Kitosan | 14 |
| 2.5 Bakteri <i>Escheria coli</i> | 15 |

| | |
|--|-----------|
| 2.6 Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> | 17 |
| 2.7 Senyawa Anti Bakteri | 20 |
| 2.8 Aktivitas Kitosan Sebagai Antibakteri | 21 |
| 2.9 <i>Response Surface Methodology</i> (RSM)..... | 23 |
| BAB III METODE PENELITIAN | 24 |
| 3.1 Bahan Penelitian..... | 24 |
| 3.2 Alat Penelitian | 24 |
| 3.3 Waktu dan tempat penelitian | 24 |
| 3.4 Prosedur Penelitian..... | 25 |
| 3.4.1 Preparasi Cangkang Kerang Hijau | 25 |
| 3.4.2 Isolasi Kitin | 25 |
| 3.4.2.1 Optimasi Deproteinasi | 25 |
| 3.4.2.2 Optimasi Demineralisasi | 26 |
| 3.4.3 Produksi Kitin pada Kondisi Optimum | 26 |
| 3.4.4 Pembuatan Kitosan | 27 |
| 3.4.5 Karakterisasi Kitin dan Kitosan | 28 |
| 3.4.5.1 Analisis Derajat Deasetilasi | 28 |
| 3.4.5.2 Pengujian Kadar Air | 29 |
| 3.4.5.3 Pengujian Kadar Abu | 29 |
| 3.4.5.4 Pengujian Kadar N-Total | 30 |
| 3.4.6 Uji Antibakteri | 30 |
| 3.4.6.1 Pembuatan Media <i>Mueller Hilton Agar</i> | 30 |
| 3.4.6.2 Pembuatan Larutan Kitosan | 30 |
| 3.4.6.3 Pengujian Aktivitas Antibakteri | 31 |
| 3.4.7 Analisis Data Statistik | 31 |

| | |
|--|----|
| BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN | 32 |
| 4.1 Optimasi Tahap Deproteinasi..... | 32 |
| 4.2 Optimasi Tahap Demineralisasi | 37 |
| 4.3 Analisis gugus fungsi dan derajat deasetilasi Kitin..... | 42 |
| 4.4 Produksi Kitosan | 44 |
| 4.5 Karakterisasi Kitin dan Kitosan | 45 |
| 4.5.1 Analisis gugus fungsi dan derajat deasetilasi Kitosan..... | 46 |
| 4.5.2 Kadar Air Kitin dan Kitosan | 47 |
| 4.5.3 Kadar Abu Kitin dan Kitosan..... | 47 |
| 4.5.4 Kadar N-Total Kitin dan Kitosan | 49 |
| 4.6 Uji Aktivitas Antibakteri Kitosan..... | 51 |
| BAB V KESIMPULAN DAN SARAN..... | 54 |
| 5.1 Kesimpulan | 54 |
| 5.2 Saran | 54 |
| DAFTAR PUSTAKA | 55 |
| LAMPIRAN | 61 |

DAFTAR TABEL

| Tabel | halaman |
|--|----------------|
| 1. ANOVA konsentrasi, temperatur, dan waktu pengadukan deproteinasi kitin..... | 34 |
| 2. ANOVA konsentrasi dan waktu pengadukan demineralisasi kitin..... | 39 |
| 3. Perbandingan gugus fungsi yang menyerap pada spektrum inframerah kitin standar dan kitin hasil isolasi dari cangkang kerang hijau | 44 |
| 4. Perbandingan gugus fungsi yang menyerap pada spektrum inframerah Kitosan standar dan kitosan hasil isolasi dari cangkang kerang hijau.. | 47 |
| 5. Hasil uji aktivitas antibakteri..... | 51 |

DAFTAR GAMBAR

| Gambar | halaman |
|---|----------------|
| 1. Kerang hijau (<i>Perna viridis</i>) | 6 |
| 2. Struktur kitin..... | 9 |
| 3. Struktur kitosan..... | 11 |
| 4. Bakteri <i>Escherichia coli</i> | 15 |
| 5. Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> | 18 |
| 6. Reaksi deproteinasi | 33 |
| 7. Penentuan titik optimum deproteinasi..... | 36 |
| 8. Reaksi demineralisasi | 40 |
| 9. Penentuan titik optimum demineralisasi | 41 |
| 10. Spektrum serapan FTIR kitin..... | 42 |
| 11. Spektrum serapan FTIR kitosan..... | 46 |

DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN

| | |
|-------|--|
| EPEC | = <i>Enteropatogenic Escherichia coli</i> |
| ETEC | = <i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i> |
| EIEC | = <i>Enteroinvasive Escherichia coli</i> |
| EHEK | = <i>Enterohemoragik Escherichia coli</i> |
| EAEC | = <i>Enteroagregative Escherichia coli</i> |
| MHA | = <i>Meuller Hilton Agar</i> |
| FTIR | = <i>Fourier Transform Infra Red</i> |
| CKH | = Cangkang Kerang Hijau |
| RSM | = <i>Response Surface Methodology</i> |
| ANOVA | = <i>Analysis of Variance</i> |

DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran | halaman |
|--|----------------|
| 1. Diagram alir penelitian..... | 61 |
| 2. Isolasi kitin | 62 |
| 3. Pembuatan kitosan | 63 |
| 4. Karakterisasi kitin dan kitosan..... | 64 |
| 5. Pembuatan media | 65 |
| 6. Uji aktivitas antibakteri | 66 |
| 7. Perhitungan optimasi deproteinasi | 67 |
| 8. Perhitungan optimasi demineralisasi | 68 |
| 9. Perhitungan kadar N-Total | 69 |
| 10. Perhitungan rendemen..... | 70 |
| 11. Perhitungan derajat deasetilasi | 71 |
| 12. Validasi optimasi proses deproteinasi dan demineralisasi | 73 |
| 13. Plot kontur optimasi deproteinasi | 74 |
| 14. Plot kontur optimasi demineralisasi | 75 |
| 15. Data hasil uji kadar air dan kadar abu | 76 |
| 16. Data spektrum FTIR kitin..... | 77 |
| 17. Data spektrum FTIR kitosan | 78 |
| 18. Dokumentasi penelitian | 79 |
| 19. Uji Kadar N-Total dengan metode <i>kjeldhal</i> | 80 |
| 20. Hasil uji antibakteri kitosan cangkang kerang hijau | 81 |

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kerang hijau (*green mussels*) merupakan salah satu jenis kerang yang banyak dibudidayakan. Kerang hijau hidup pada perairan *estuary-mangrove* dan daerah teluk dengan substrat pasir berlumpur serta berkadar garam sedang. Budidaya kerang hijau terbilang mudah, karena kerang hijau mampu bertahan hidup dan berkembang biak pada tekanan lingkungan yang tinggi dan tanpa pemberian pakan. Volume produksi kerang hijau di Indonesia dari tahun 2014-2018 berturut-turut adalah 12.869 ton, 12.991 ton, 16.348 ton, 18.896 ton dan 15.623 ton (WWF Indonesia, 2019).

Kerang hijau memiliki kandungan gizi yang sangat baik untuk dikonsumsi. Setiap 200 gram kerang hijau mengandung air 40,80 %, protein 21,9 %, karbohidrat 18,5 %, lemak 14,5 %, dan abu 4,3 % (Affandi dan Tang, 2002). Kerang hijau mengandung daging sekitar 30 % dari berat keseluruhan dengan demikian sekitar 70 % dibuang sebagai cangkang. Cangkang kerang hijau belum dimanfaatkan secara optimal, hanya sebagian kecil yang dimanfaatkan untuk kerajinan tangan, dan sumber kalsium campuran makanan ternak. Limbah tersebut berpotensi menjadi pencemar lingkungan (Sarwono, 2010).

Selain berpotensi sebagai campuran makanan ternak dan beberapa manfaat lainnya, cangkang kerang hijau juga dapat dimanfaatkan untuk pembuatan kitin melalui proses isolasi. Proses isolasi kitin dilakukan dengan tiga tahap yaitu proses deproteinasi, demineralisasi dan depigmentasi. Tahap deproteinasi adalah tahap penghilangan protein menggunakan larutan alkali, tahap demineralisasi

adalah tahap untuk menghilangkan senyawa anorganik dengan larutan asam dan tahap depigmentasi bertujuan menghilangkan pigmen pada kitin dengan menggunakan aseton atau natrium hipoklorit (Tokatli dan Demirdoven, 2017).

Tingkat kemurnian kitin yang dihasilkan dapat dilihat dari derajat deasetilasi, semakin tinggi derajat deasetilasi maka semakin baik kualitas kitin. Konsentrasi pelarut yang digunakan, temperatur serta lama waktu isolasi berpengaruh terhadap kualitas kitin yang diperoleh. Proses optimasi isolasi kitin dapat dilakukan untuk memperoleh kondisi optimum isolasi kitin. Salah satu metode optimasi yang dapat digunakan yaitu *Response Surface Methodology* (RSM) atau metode respon permukaan yang merupakan metode statistik dan matematika teknik yang berguna untuk mengembangkan, meningkatkan dan mengoptimalkan proses. Gagasan utama dari metode ini adalah mengetahui pengaruh variabel bebas terhadap respon. Keunggulan metode RSM yaitu tidak memerlukan data-data percobaan dalam jumlah besar dan tidak membutuhkan waktu yang lama (Nurmiah dkk, 2013).

Kitin yang diperoleh dari proses isolasi memiliki banyak potensi, salah satu potensi kitin yaitu dapat digunakan untuk pembuatan kitosan melalui proses deasetilasi menggunakan larutan alkali dengan konsentrasi dan suhu yang tinggi. Kitosan memiliki sifat unik seperti larut dalam larutan asam, tidak beracun, biodegradable dan biokompatibel. Berdasarkan sifat-sifat ini, kitosan banyak digunakan dalam industri, obat-obatan dan tekstil (Danarto dan Distantina, 2016).

Kitosan juga digunakan sebagai antiseptik atau *hand sanitizer*. Kitosan bersifat *osteoconductive*, bioaktif, dan dapat meningkatkan penyembuhan luka karena mempunyai sifat antibakteri (Nather dkk., 2005). Kitosan telah banyak digunakan sebagai anti mikroba alami pada bahan pangan dan makanan karena

muatan positif kitosan dapat berinteraksi dengan permukaan sel bakteri yang bermuatan negatif, sehingga dapat mengganggu pertumbuhan bakteri, salah satunya sebagai antibakteri untuk bakteri *Escheria coli* dan *Staphylococcus auerus* (Umiruddin dan Surahmaida, 2019).

Bakteri *E. coli* adalah salah satu jenis bakteri yang sering dibicarakan. Pengetahuan masyarakat cukup banyak tentang *E. coli* walaupun terbatas bahwa bakteri ini adalah penyebab infeksi saluran pencernaan. Pada umumnya, bakteri ini dapat ditemukan dalam usus besar manusia, seperti *E. Coli* tipe O157:H7 dapat mengakibatkan keracunan makanan yang serius pada manusia. Sumber bakteri ini contohnya adalah daging yang belum masak atau setengah matang yang banyak dikonsumsi masyarakat (Killay, 2013).

Bakteri *E. coli* dalam jumlah yang berlebihan dapat mengakibatkan diare, dan bila bakteri ini menjalar ke sistem atau organ tubuh yang lain, maka akan dapat menyebabkan infeksi (Killay, 2013). Begitu pula dengan bakteri *S. auerus*, secara umum, bakteri ini tidak kuat bersaing dengan mikroorganisme lainnya sehingga bakteri ini tidak mempunyai peran yang berarti pada bahan pangan yang tidak dimasak, akan tetapi dalam bahan pangan yang telah dimasak atau diasinkan, di mana mikroorganisme yang lain telah rusak selama pemanasan atau pertumbuhannya terhambat oleh konsentrasi garam, sel bakteri *S. aureus* dapat terus berkembang mencapai tingkat yang membahayakan (Sarwono, 2010).

Beberapa penelitian sebelumnya seperti yang dilakukan oleh Ariyanti dkk pada tahun 2019 “Rendemen Kitosan Limbah Cangkang Kerang Hijau dari Kendal Jawa Tengah” dan diperoleh rendemen kitosan tertinggi pada konsentrasi NaOH 75 % (b/v) yaitu 6,972 %, dan konsentraasi NaOH 15 % (b/v) memiliki rendemen kitosan terendah yaitu 4,190 %. Penelitian lainnya yang dilakukan

Masindi dan Herdyastuti pada tahun 2017 “Karakterisasi Kitosan dari Cangkang Kerang Darah (*Anadara granosa*)”, dihasilkan karakteristik kitosan yaitu kadar air sebesar 1,16 %, kadar abu 1,25 % dan derajat deasetilasi 91,7 %. Penelitian yang dilakukan oleh Sulastiyoningrum dkk pada tahun 2013 “Aktivitas Anti Bakteri Kitosan dari Cangkang Kerang Simpson pada Kondisi Lingkungan yang Berbeda”, diperoleh hasil yaitu kadar kitin sebesar 21,6 %, kadar kitosan yaitu 18,34 %, derajat deasetilasi (DD) sebesar 69,11 %, zona hambat antibakteri pada konsentrasi 0,01 µg/disk dan 0,02 µg/disk. Salinitas dan pH berpengaruh terhadap pembentukan zona hambat. Bakteri *S. aureus* lebih sensitif terhadap pH daripada bakteri *E. coli*.

Berdasarkan uraian diatas, pada penelitian ini perlu menentukan proses isolasi untuk memproduksi kitin dan kitosan dengan kondisi optimum serta melakukan pengujian terhadap kemampuan kitosan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *S. aureus*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. bagaimana kondisi optimum proses isolasi kitin dan kitosan dari limbah cangkang kerang hijau??
2. bagaimana karakteristik kitin dan kitosan dari limbah cangkang kerang hijau ?
3. berapa kadar kitin dan kitosan dari limbah cangkang kerang hijau yang diperoleh dari proses isolasi secara optimum?

4. berapa konsentrasi kitosan yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escheria coli* dan *Staphylococcus aureus* secara *invitro*?

1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

1.3.1 Maksud Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah, maka maksud dari penelitian ini adalah mengisolasi dan mengkarakterisasi kitin dan kitosan dari cangkang kerang hijau serta menentukan aktivitasnya sebagai antibakteri *Escheria coli* dan *Staphylococcus aureus* secara *invitro*.

1.3.2 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah maka tujuan penelitian ini adalah:

1. mengisolasi dan mengoptimasi produksi kitin dan kitosan dari cangkang kerang hijau 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 kerang hijau.
3. menentukan kadar kitin dan kitosan dari cangkang kerang hijau pada kondisi optimum.
4. menentukan konsentrasi kitosan yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escheria coli* dan *Staphylococcus aureus* secara *invitro*.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diperoleh dari penelitian ini adalah memberikan informasi mengenai karakteristik kitin dan kitosan cangkang kerang hijau serta manfaatnya sebagai antibakteri terhadap bakteri *Escheria coli* dan *Staphylococcus aureus*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kerang Hijau (*Perna viridis*)

Kerang hijau (*Perna viridis*) disajikan pada Gambar 1, termasuk binatang lunak (moluska) yang hidup di laut terutama pada daerah litoral, memiliki sepasang cangkang (bivalvia), berwarna hijau agak kebiruan. Insangnya berlapis-lapis (*Lamelii branchia*) dan berkaki kapak (*Pelecypoda*) serta memiliki benang *byssus* (Cappenberg, 2008).



Gambar 1. Kerang Hijau (Sanjeevi, 2019)

Menurut Cappenberg (2008) taksonomi kerang hijau sebagai berikut:

Kingdom : Animalia
Filum : Moluska
Class : Bivalvia
Sub klas : Lamellibranchiata
Ordo : Anisomyria
Family : Mytilidae
Sub family : Mytilinae
Genus : *Perna*
Spesies : *Perna viridis*

Kerang hijau adalah "*suspension feeder*", dapat berpindah-pindah tempat dengan menggunakan kaki dan benang "*byssus*", hidup dengan baik pada perairan dengan kisaran kedalaman 1 - 7 m, memiliki toleransi terhadap perubahan salinitas antara 27 - 35 per mil (Cappenberg, 2008). Kerang hijau atau dikenal sebagai *green mussels* adalah jenis yang memiliki nilai ekonomis tinggi. Tersebar luas di perairan Indonesia dan ditemukan melimpah pada perairan pesisir, daerah mangrove dan muara sungai, di Indonesia jenis ini ditemukan melimpah pada bulan Maret hingga Juli pada areal pasang surut dan subtidal, hidup bergerombol dan menempel kuat dengan menggunakan benang *byssus*-nya pada benda-benda keras seperti kayu (Hendrik, 2018).

Kerang hijau merupakan salah satu biota laut yang mampu bertahan hidup dan berkembang biak pada tekanan ekologis yang tinggi tanpa mengalami gangguan yang berarti, dengan sifat dan kemampuan adaptasi tersebut, kerang hijau telah banyak digunakan dalam usaha budidaya perikanan. Kerang hijau dapat tumbuh hanya dengan menggunakan atau menancapkan bambu atau kayu ke dalam perairan yang terdapat banyak bibit kerang hijau, maka kerang tersebut dengan mudah menempel dan berkembang tanpa harus diberi makan (Hendrik, 2018).

Kerang hijau memiliki banyak nama daerah (*local common name*) di Indonesia yaitu di daerah Riau dikenal dengan nama kemudi kapal; di Banten dengan nama kedaung, di Malaysia dikenal dengan nama siput sudu; di Filipina dikenal dengan nama *tahong*; di Thailand dengan nama *hoimong poo*, dan di Singapura dikenal dengan nama *tam cay* atau *chay luan* (Hendrik, 2018).

Kerang hijau memiliki kandungan gizi yang tinggi, yaitu kandungan protein kerang hijau sebesar 21,9 %, lemak sebesar 14,5 %, karbohidrat 18,5 %,

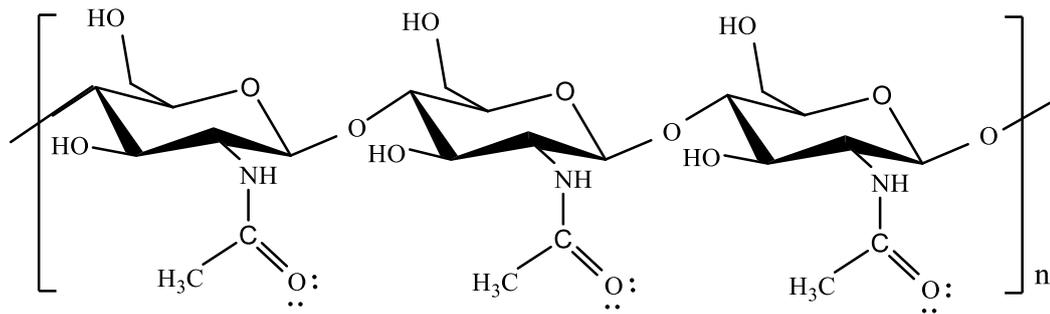
abu 4,3% dan air 40,8 % setiap 200 gram kerang hijau (Affandi dan Tang, 2002). Kandungan gizi ini sebanding dengan gizi daging sapi, telur maupun daging ayam. Kerang hijau dapat menyediakan sumber nutrisi yang penting bagi makanan manusia (Sulvina, 2018).

Kerang hijau mempunyai potensi besar untuk dimanfaatkan, karena populasinya cukup besar di perairan Indonesia. Pada tahun 2014 hingga tahun 2018 rata-rata produksi kerang hijau yaitu 15.345 ton dengan volume produksi berturut-turut adalah 12.869 ton, 12.991 ton, 16.348 ton, 18.896 ton dan 15.623 ton (WWF Indonesia, 2019). Hal ini disebabkan karena budidaya kerang hijau mudah dilakukan karena tidak membutuhkan banyak perlakuan dan perawatan terhadap benih hingga kerang dewasa.

Menurut Ali dkk, (2015) kerang hijau juga dapat dimanfaatkan untuk menstabilkan kualitas air karena memiliki sifat *filter feeder*. kerang hijau merupakan salah satu jenis kerang yang digemari masyarakat, memiliki nilai ekonomis, dan kandungan gizi yang sangat baik untuk dikonsumsi.

2.2 Kitin

Kitin (β -(1-4)-asetamida-2-deoksi-D-glukosa) atau N-asetil-D-glukosamin, struktur kitin disajikan pada Gambar 2, adalah polisakarida amino alami yang paling melimpah dan diperkirakan diproduksi setiap tahun hampir sebanyak selulosa. Hal ini sangat menarik tidak hanya sebagai sumber daya yang kurang dimanfaatkan, tetapi juga sebagai bahan fungsional baru yang berpotensi tinggi di berbagai bidang (Junior dkk., 2016).



Gambar 2. Struktur kitin (Pontius, 2016)

Sifat kitin yang tidak beracun dan mudah terdegradasi mendorong dilakukannya modifikasi kitin dengan tujuan mengoptimalkan kegunaan maupun memperluas bidang aplikasi kitin (Wiyarsi dan Priyambodo, 2009). Kitin banyak berasal dari dua krustasea laut seperti udang dan kepiting. Turunan kitin adalah kitosan, diperoleh secara parsial asetilasi kitin dalam kondisi basa atau hidrolisis enzimatik. Bahan berbasis kitosan juga telah disarankan sebagai koagulan dan flokulan yang berpotensi sangat ramah lingkungan untuk air dan pengolahan air limbah karena karakteristik biologi dan biodegradabilitasnya (Pontius, 2016). Kitin yang paling banyak ditemukan di kepiting adalah 50 % - 60 %, udang 42 % -57 %, cumi-cumi 40 %, dan kerang 14 – 35 % (Junior dkk., 2016).

Kitin diisolasi melalui 3 tahap yaitu deproteinasi, demineralisasi dan depigmentasi. Tahap deproteinasi merupakan tahap untuk melepaskan ikatan protein dengan menggunakan larutan basa. Proses deproteinasi akan mempengaruhi kualitas kitin dari segi kadar protein. Semakin kecil kadar protein semakin baik kualitas kitin yang dihasilkan. Proses deproteinasi dapat dilakukan dengan penambahan pereaksi kimia seperti NaOH atau secara enzimatik dengan penambahan enzim protease. Hal ini disampaikan dari hasil penelitian yang dilakukan Masindi dan Herdyastuti (2017) dengan variasi volume enzim yaitu 1;5,

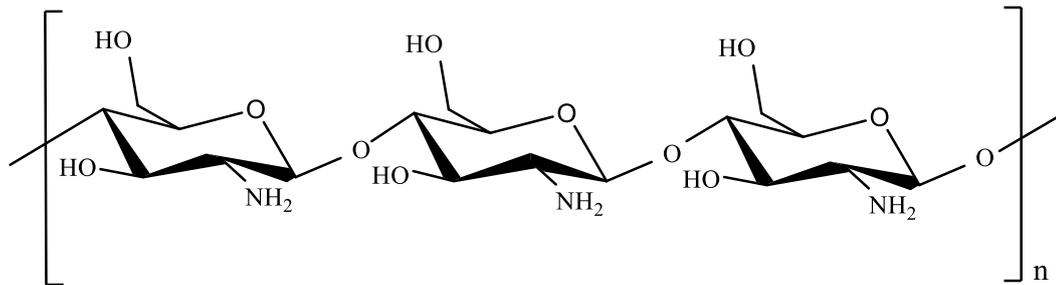
1;10, 1;15 dan 1;20 (b/v). Proses inkubasi dilakukan pada suhu 50 °C karena relatif enzim protease kondisi inkubasinya berada pada suhu tersebut. Hasil uji kadar protein diperoleh semakin banyak volume enzim yang digunakan, maka semakin rendah kadar protein karena semakin banyak ikatan peptida yang terputus. Semakin besar konsentrasi enzim maka semakin cepat pula reaksi berlangsung. Tahap selanjutnya adalah demineralisasi, yaitu tahap penghilangan senyawa-senyawa anorganik dan komponen-komponen mineral. Proses penghilangan mineral dapat dilakukan dengan menggunakan larutan asam. Tahap terakhir adalah depigmentasi yang bertujuan menghilangkan pigmen warna maupun zat-zat pengotor, pada tahap ini dapat digunakan larutan natrium hipoklorit, aseton ataupun hidrogen peroksida (Sartika dkk., 2016).

Proses deasetilasi (penghilangan gugus asetil) kitin menjadi kitosan dapat dilakukan secara kimiawi maupun enzimatis. Secara kimiawi, deasetilasi kitin dilakukan dengan penambahan NaOH, sedangkan secara enzimatis digunakan enzim kitin deasetilase. Deasetilasi adalah proses pemutusan gugus asetil dari glukosamin, derajat deasetilasi menunjukkan banyaknya gugus asetil yang putus dari gugus glukosamin dan jumlah presentase dari gugus amino pada struktur polimer. Semakin besar derajat deasetilasi maka semakin banyak pula kitosan yang terbentuk dari kitin, sehingga lebih mudah larut dalam asam encer. Deasetilasi kitin akan menghilangkan gugus asetil dan menyisakan gugus amino yang bermuatan positif, sehingga kitosan bersifat polikationik (Maidin, 2017).

2.3 Kitosan

Kitosan (β -(1-4)-2-amino-2-deoksi-D-glukosa), struktur kimia disajikan pada Gambar 3, merupakan polisakarida rantai lurus yang tersusun oleh monomer

glukosamin yang terhubung melalui ikatan (1-4) β -glikosidik. Kitosan dapat diperoleh dari proses deasetilasi kitin. Kitin merupakan poli-N-asetil-glukosamin, sedangkan kitosan adalah kitin terdeasetilasi sebanyak mungkin tapi tidak cukup sempurna untuk dinamakan poli glukosamin (Gyliene dkk., 2003).



Gambar 3. Struktur kitosan (Pontius, 2016)

Proses deasetilasi kitin menggunakan larutan NaOH pekat bertujuan untuk mengubah gugus asetil dari kitin menjadi gugus amina pada kitosan. Perubahan ini dapat dideteksi dengan melihat perubahan spektrum IR kitin dengan hasil deasetilasinya pada panjang gelombang tertentu yang karakteristik (Gyliene dkk., 2003). Proses deasetilasi merupakan proses yang akan menentukan mutu kitosan. Semakin tinggi derajat deasetilasi maka mutu kitosan semakin baik. Penggunaan konsentrasi NaOH mempengaruhi derajat deasetilasi kitosan, seperti penelitian yang dilakukan Wulandari dkk (2020), pengaruh variasi konsentrasi NaOH terhadap derajat deasetilasi kitosan, konsentrasi NaOH yang digunakan yaitu 50, 55 dan 60 % dan diperoleh derajat deasetilasi tertinggi pada konsentrasi NaOH 60 %. Konsentrasi NaOH yang semakin tinggi mengakibatkan semakin banyaknya gugus hidroksil yang dapat menyebabkan terjadinya reaksi adisi pada gugus karbonil kitin sehingga pembentukan amina semakin banyak dan derajat deasetilasi meningkat (Mursida dkk, 2018).

Kitosan merupakan produk biologis yang bersifat kationik, nontoksik, biodegradable dan biokompatibel. Kitosan memiliki gugus amino (NH_2) yang relatif lebih banyak dibandingkan kitin sehingga lebih nukleofilik dan bersifat basa. Kristalinitas kitosan yang disebabkan oleh ikatan hidrogen intermolekuler maupun intramolekuler lebih rendah dibandingkan kitin sehingga lebih mudah diaplikasikan dalam beberapa reagen. Kitosan tidak larut dalam air dan beberapa pelarut organik seperti dimetilsulfoksida (DMSO), dimetilformamida (DMF), pelarut alkohol organik dan piridin. Kitosan larut dalam asam organik atau mineral encer melalui protonasi gugus amino bebas ($\text{NH}_2 \rightarrow \text{NH}_3^+$) pada pH kurang dari 7 (Gyliene dkk., 2003).

Kemajuan dalam bidang industri dan bioteknologi memungkinkan dilakukannya proses enzimatik dalam sintesis kitosan. Enzim bersifat spesifik terhadap substrat yang akan dikatalisisnya, serta memiliki daya katalitik yang besar. Proses analisis dengan menggunakan enzim umumnya dengan cara mereaksikan substrat dengan enzim yang telah dilarutkan dalam air. Proses enzimatik pada industri menggunakan golongan protease, dimana salah satunya adalah papain (Cahyaningrum dkk., 2007).

Kitosan telah banyak digunakan dalam studi laboratorium sebagai koagulan untuk menghilangkan *Chlorella sp.* atau alga air pada air keruh. Seperti penelitian yang dilakukan oleh Sinardi dan Notodarmodjo pada tahun 2013 yaitu pembuatan kitosan dari cangkang kerang hijau sebagai koagulan penjernih air, diperoleh rendemen kitosan yang didapatkan yaitu 28 %. Karakteristik kitosan cangkang kerang hijau seperti kadar air 0,4 %, kadar abu 1,02 % dan derajat desetilasi yaitu 38,91 %. Aplikasi kitosan sebagai koagulan menggunakan *Jartest Flocculator SW1 (Stuart Scientific)*. Sampel air keruh sintetik dibuat menyerupai

karakteristik air baku alami dengan menggunakan kaolin yang mewakili *suspended solids* dan asam humat mewakili materi organik. Penyisihan kekeruhan optimum pada pH 9 dibandingkan dengan pH 5 dan pH 7. Sedangkan dosis optimum sebanyak 250 mg/L kitosan dengan penyisihan sebesar 92,6 %.

Kitosan juga banyak digunakan untuk panen mikroalga. Kitosan juga sering digunakan pada industri komersial karena kitosan dapat didaur ulang dan sangat baik digunakan sebagai agen pengkelat untuk banyak logam seperti arsenik, molibdenum, kadmium, kromium, timbal, dan kobalt (Yang dkk., 2016). Kitosan dapat menjadi pengganti potensial untuk garam aluminium dan polielektrolit sintetik dalam pengolahan air karena dapat: (1) menghindari efek kesehatan dari residu aluminium dan polimer sintetik; (2) menghasilkan lumpur biodegradabel; dan (3) menggunakan kembali sumber laut (Jiang dkk., 2012), karena strukturnya, kitosan memiliki sifat unik seperti larut dalam larutan asam, tidak beracun, biodegradabel, biokompatibel, dan antimikroba, karena sifat-sifat ini, kitosan banyak digunakan dalam makanan industri, obat-obatan dan obat-obatan, dan tekstil.

Penggunaan kitosan di bidang farmasi, terutama dalam hal mengendalikan dekomposisi obat. Struktur kitosan memiliki 3 buah gugus fungsi yaitu gugus hidroksil primer, gugus hidroksil sekunder dan gugus amino primer. Keberadaan kelompok-kelompok ini memungkinkan modifikasi kitosan untuk mendapatkan senyawa turunan yang bermanfaat. Kelompok amino memungkinkan reaksi modifikasi seperti kuarternisasi, okulasi, esterifikasi, dan lainnya. Selain itu senyawa-senyawa ini memiliki sifat unggul seperti anti-bakteri, anti-jamur, tidak

beracun, dan lainnya. Sedangkan gugus hidroksil memungkinkan reaksi asetilasi dan okulasi (Danarto dan Distantina, 2016).

2.4 Pemanfaatan Kitosan

Kitosan memiliki manfaat yang sangat banyak, beberapa diantaranya:

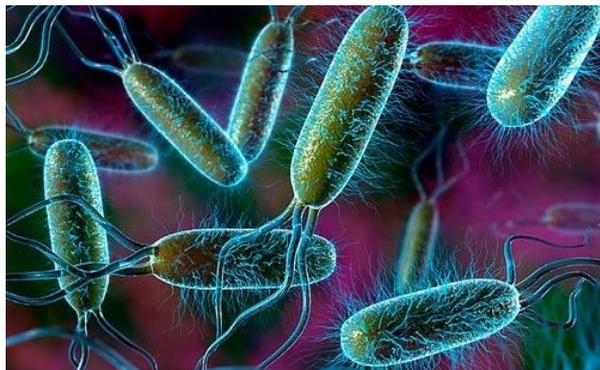
1. Kitosan telah banyak digunakan sebagai anti mikroba alami pada bahan pangan dan makanan karena muatan positif kitosan dapat berinteraksi dengan permukaan sel bakteri yang bermuatan negatif, sehingga dapat mengganggu pertumbuhan bakteri, kitosan menjadi pilihan sebagai anti mikroba karena bersifat alami serta tidak membahayakan bagi kesehatan (Umiruddin dan Surahmaida, 2019).
2. Kitosan telah digunakan secara luas dalam bidang medis terutama sebagai biopolimer yang biasanya digabungkan dengan material pengganti tulang dan gigi karena bersifat *biocompatible*, *biodegradable* dan non-toksik (Nather dkk., 2005).
3. Kitosan juga bersifat *osteoconduktive*, bioaktif, dan dapat meningkatkan persembuhan luka karena mempunyai sifat antimikroba yang membuatnya menarik untuk digunakan sebagai pelapis bioaktif dalam meningkatkan *osseointegrasi* dari implan tulang (Nather dkk., 2005).
4. Kitosan banyak diaplikasikan pada bidang adsorben sebagai atom penjerap ion logam berat dalam pengolahan air, pengawet, aditif makanan, pewarna, pigmen dalam rekayasa limbah, dan anti kolesterol (Thariq, 2016).
5. Kitosan telah banyak digunakan sebagai koagulan untuk menghilangkan *Chlorella sp.* atau alga air pada air keruh. Kitosan juga banyak digunakan

untuk menghilangkan kekeruhan dari air serta untuk panen mikroalga (Yang dkk., 2016).

6. Lebih dari 20 tahun terakhir, kitin dan kitosan digunakan dalam bidang kesehatan di Jepang, diantaranya dapat digunakan sebagai obat, mengobati luka bakar, komponen pada lensa kontak, komponen dalam alat-alat operasi seperti sarung tangan, benang operasi, membran pada operasi plastik (Wisuda dkk., 2014).
7. Kitosan juga digunakan pada bidang kosmetik sebagai pelembab dan lotion (Wisuda dkk., 2014).

2.5 Bakteri *Escherichia coli*

Bakteri *E. coli*, dapat dilihat pada Gambar 4, merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang pendek yang memiliki panjang sekitar 2 μm , diameter 0,7 μm , lebar 0,4-0,7 μm dan bersifat anaerob fakultatif. *E. coli* membentuk koloni yang bundar, cembung, dan halus dengan tepi yang nyata (Brooks dkk., 2014).



Gambar 4. Bakteri *Escherichia coli* (Barr, 2018)

Menurut Brooks dkk., (2014) taksonomi Bakteri *Escherichia coli* sebagai berikut:

Kingdom : Eubacteria
Divisio : Gracilicutes
Class : Scotobacteria
Ordo : Eubacteriales
Family : Enterobacteriaceae
Genus : *Escherichia*
Spesies : *Escherichia coli*

Pertumbuhan *E. coli* optimum pada suhu 37 °C. *E. coli* mempunyai beberapa antigen, yaitu antigen O (polisakarida), antigen K (kapsular), antigen H (flagela). Antigen O merupakan antigen somatik berada dibagian terluar dinding sel lipopolisakarida dan terdiri dari unit berulang polisakarida. Antibodi terhadap antigen O adalah IgM. Antigen K adalah antigen polisakarida yang terletak di kapsul (Juliantina dkk., 2008).

E. coli adalah anggota flora normal usus. *E. coli* berperan penting dalam sintesis vitamin K, konversi pigmen-pigmen empedu, asam-asam empedu dan penyerapan zat-zat makanan. *E. coli* termasuk ke dalam bakteri heterotrof yang memperoleh makanan berupa zat organik dari lingkungannya karena tidak dapat menyusun sendiri zat organik yang dibutuhkan oleh bakteri *E. coli*. *E. coli* yang menyebabkan diare banyak ditemukan di seluruh dunia. Molita (2017) mengklasifikasikan *E. coli* oleh ciri khas sifat-sifat virulensinya, dan setiap kelompok menimbulkan penyakit melalui mekanisme yang berbeda. Ada lima kelompok galur *E. coli* yang patogen, yaitu:

1. *E. coli* Enteropatogenik (EPEC)

EPEC penyebab penting diare pada bayi, khususnya di negara berkembang. EPEC sebelumnya dikaitkan dengan wabah diare pada anak-anak di negara maju. EPEC melekat pada sel mukosa usus kecil.

2. *E. coli* Enterotoksigenik (ETEC)

ETEC penyebab yang pada bayi di negara berkembang. Faktor kolonisasi ETEC yang spesifik untuk manusia menimbulkan pelekatan ETEC pada sel epitel usus kecil.

3. *E. coli* Enteroinvasif (EIEC)

EIEC menimbulkan penyakit yang sangat mirip dengan shigelosis. Penyakit yang paling sering pada anak-anak di negara berkembang dan para wisatawan yang menuju negara tersebut.

4. *E. coli* Enterohemoragik (EHEK)

EHEK menghasilkan verotoksin, dinamai sesuai efek sitotoksiknya pada sel Vero, suatu ginjal dari monyet hijau Afrika.

5. *E. coli* Enteroagregatif (EAEC)

EAEC menyebabkan diare akut dan kronik pada masyarakat di Negara berkembang.

2.6 Bakteri *Staphylococcus aureus*

Bakteri *S. aureus*, disajikan pada Gambar 5, merupakan bakteri gram positif, berbentuk bulat dengan diameter 0,8 - 1 mikron, bergerombol menyerupai untaian anggur, non motil, tidak membentuk spora, dapat tumbuh dalam media dengan konsentrasi NaCl hingga 15 % (pada media MSA berwarna kuning) (Tyasningsih dkk., 2010).



Gambar 5. *Staphylococcus aureus* (Yazhed, 2016)

Menurut Ferianto (2012) klasifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* sebagai berikut:

Kingdom : Eubacteria
Divisio : Protophyta
Class : Schizomycetes
Ordo : Eubacteriales
Family : Micrococceae
Genus : *Staphylococcus*
Spesies : *Staphylococcus aureus*

S. aureus tumbuh pada suhu 6,5 – 46 °C dan pada pH 4,2 - 9,3. Koloni tumbuh dalam waktu 24 jam dengan diameter mencapai 4 mm. *S. aureus* membentuk pigmen *lipochrom* yang menyebabkan koloni tampak berwarna kuning keemasan dan kuning jeruk. *S. aureus* pada media *Mannitol Salt Agar* (MSA) akan terlihat sebagai pertumbuhan koloni berwarna kuning (Dewi, 2013). *S. aureus* mampu menghasilkan enzim katalase yang berperan dalam proses pengubahan hidrogen peroksida (H₂O₂) menjadi hidrogen (H₂) dan oksigen (O₂), karena hal tersebut *S. aureus* dikatakan bersifat katalase positif dimana hal ini dapat membedakannya dari genus *Streptococcus*. *S. aureus* juga menunjukkan

kemampuan untuk menghasilkan enzim koagulase yang dapat membedakannya dari *Staphylococcus* jenis lainnya, seperti *S. epidermidis*. *S. aureus* memiliki kemampuan untuk memfermentasikan manitol menjadi asam, hal ini dapat dibuktikan bila *S. aureus* dibiakkan dalam agar Manitol, dimana terjadi perubahan pH dan juga perubahan warna dari merah ke kuning (Dewi, 2013).

S. aureus tidak terdapat pada bahan pangan yang tidak dimasak, hal ini dikarenakan *S. aureus* tidak kuat bersaing dengan mikroorganisme lainnya, akan tetapi *S. aureus* banyak terdapat pada bahan makanan yang telah dimasak ataupun diasinkan, dimana mikroorganisme yang lain biasanya akan rusak selama proses pemasakan atau pertumbuhannya terhambat oleh konsentrasi garam, tetapi sel *S. aureus* dapat terus berkembang hingga mencapai tingkat yang membahayakan (Sarwono, 2010).

Keracunan bahan pangan yang tercemar *S. aureus* umumnya berhubungan dengan produk pangan yang telah dimasak terutama daging dan ayam. Sumber utama kontaminasi makanan oleh *S. aureus* adalah dari manusia. Kebanyakan *S. aureus* terdapat pada tangan pekerja sebagai komponen mikroflora endogen, dan juga terdapat pada saluran hidung dan tenggorokan. *S. aureus* juga mungkin ada di udara, debu, air, susu, pangan, peralatan pangan, dan permukaan lingkungan *S. aureus* dapat berpindah lewat bersin, batuk, kontak jari, kontak bibir, gigitan, dan sapu tangan. Selain itu beberapa strain *S. aureus* juga dapat membentuk koloni pada peralatan dan lingkungan tempat pengolahan makanan (Sarwono, 2010).

S. aureus merupakan flora normal pada kulit, pernafasan, dan gastrointestinal manusia. Bakteri ini juga ditemukan pada pakaian, seprei, dan lingkungan manusia. Kapasitas patogen dari strain *S. aureus* merupakan efek

kombinasi dari faktor ekstra selular dan toksin. Salah satu penyakit yang disebabkan oleh bakteri *S aureus* adalah keracunan makanan, selain itu juga banyak menimbulkan infeksi. Infeksi yang disebabkan oleh *S aureus* dapat ditandai dengan kerusakan jaringan disekitar dan menimbulkan abses berupa nanah, luka mengalami nekrosis, kemudian disekitar pembuluh getah bening terjadi koagulasi fibrin, sehingga pada proses nekrosis dibatasi oleh dinding (Sarwono, 2010).

2.7 Senyawa Antibakteri

Senyawa antibakteri adalah senyawa biologis atau senyawa kimia yang dapat menghambat pertumbuhan dan aktivitas mikroba. Mekanisme kerja senyawa yang bersifat antibakteri ada beberapa macam, yaitu merusak dinding sel mikroorganisme hingga terjadi lisis, mengubah permeabilitas membran sitoplasma sehingga menyebabkan kebocoran nutrisi dari dalam sel, menyebabkan terjadinya denaturasi protein sel, dan menghambat kerja enzim di dalam sel, merusak molekul protein dan asam nukleat, bersifat sebagai antimetabolit, menghambat sintesa asam nukleat (Ferianto, 2012).

Agen senyawa antibakteri dapat digolongkan menurut jasad renik yang dibasmi, yaitu antibiotik, antivirus, antifungi, antiprotozoa dan antihelminthes. antibakteri juga dibagi menjadi dua kelompok luas, yaitu golongan bakteriostatik yang menghambat replikasi mikroba, dan golongan bakterisidal yang secara bekerja secara utama membunuh mikroba (Brown dkk., 2012). Zat-zat yang digunakan sebagai antibakteri harus mempunyai beberapa kriteria ideal, antara lain aman, ekonomis, tidak menyebabkan perubahan citarasa dan aroma pada makanan, tidak mengalami penurunan aktivitas karena adanya komponen

makanan, tidak menyebabkan timbulnya galur resisten, sebaiknya bersifat membunuh daripada hanya menghambat pertumbuhan mikroba serta memiliki spektrum yang luas karena jenis mikroba dalam pangan umumnya beragam jenis (Direja, 2007).

Menurut Branen dan Davidson (1993), senyawa kimia yang memiliki sifat sebagai antibakteri adalah sodium benzoat, asam benzoat, asam sorbat, asam asetat, sulfur dioksida, nitrit, paraben, komponen fenolik, asam lemak rantai, ester, dimetil dikarbonat, dietil dikarbonat, nisin, natamisin, bakteriosin, halogen, senyawa surfaktan dan peroksida. Serta senyawa fitokimia yang terdapat dalam tumbuhan seperti golongan fenolik, alkaloid, dan terpenoid memiliki aktivitas antibakteri.

2.8 Aktivitas Kitosan Sebagai Antibakteri

Kitosan memiliki sifat anti bakteri karena dapat menghambat bakteri patogen dan mikroorganisme pembusuk, termasuk jamur, bakteri gram positif, bakteri gram negatif. Kitosan digunakan sebagai pelapis (*film*) pada berbagai bahan pangan, tujuannya adalah menghalangi oksigen masuk dengan baik, sehingga dapat digunakan sebagai kemasan berbagai bahan pangan dan juga dapat dimakan langsung, karena kitosan tidak berbahaya terhadap kesehatan (Azeredo dkk., 2010). Senyawa kitosan mempunyai sifat mengganggu aktivitas membran luar bakteri gram negatif. Pemakaian kitosan sebagai bahan pengawet juga tidak menimbulkan perubahan warna dan aroma (Setiawan, 2012). Senyawa kitosan yang berpotensi sebagai bahan antimikrobia bisa ditambahkan pada bahan makanan karena tidak berbahaya bagi manusia. Pada manusia kitosan tidak dapat dicerna sehingga tidak punya nilai kalori dan langsung dikeluarkan oleh tubuh

bersama *feces*. Kitosan memiliki sifat penghalang metabolisme sel membran bagian luar (Killay, 2013).

Penelitian yang dilakukan oleh Sulastiyoningrum dkk pada tahun 2013 yang menggunakan cangkang kerang simping sebagai antibakteri terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus* dan digunakan parameter perairan yaitu pH dan salinitas. Pertumbuhan dan perkembangan mikroorganisme dipengaruhi oleh konsentrasi ion hidrogen seperti pH. Kebanyakan bakteri tumbuh hanya dengan rentang pH 4 - 9. Zona hambat pada bakteri *E. coli* dan bakteri *S. aureus* pada media yang disesuaikan pH nya . Hasil yang terlihat yaitu kitosan lebih aktif pada bakteri *S. aureus*, zona hambat yang terbentuk lebih besar daripada bakteri *E. coli*, hal ini disebabkan ketahanan masing-masing bakteri terhadap kondisi pH berbeda, bakteri *S.aureus* tumbuh optimum pada kondisi pH antara 7 - 7,5, sedangkan *E. coli* dapat tumbuh optimum pada pH 6 – 7. Zona hambat pada bakteri *E. coli* dan bakteri *S. aureus* pada media yang disesuaikan salinitasnya dan didapatkan kitosan lebih aktif pada bakteri *E.coli*. Kesimpulan yang diperoleh yaitu Bakteri *E. coli* lebih sensitif terhadap salinitas daripada bakteri *S. aureus*, dan bakteri *S.aureus* lebih sensitif terhadap pH daripada bakteri *E. coli*.

Kitosan sangat berpotensi untuk dijadikan sebagai bahan antibakteri, karena mengandung enzim lisozim dan gugus aminopolisakarida yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba. Enzim lisozim merupakan enzim yang sanggup mencerna dinding sel bakteri sehingga bakteri akan kehilangan kemampuannya menimbulkan penyakit dalam tubuh (hilangnya dinding sel ini menyebabkan sel bakteri akan mati). Kemampuan dalam menekan pertumbuhan bakteri disebabkan bahwa kitosan memiliki polikation bermuatan positif yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri (Killay, 2013).

2.9 Response Surface Methodology (RSM)

Response Surface Methodology adalah suatu kumpulan dari teknik-teknik statistika dan matematika yang berguna untuk menganalisis permasalahan optimalisasi tentang beberapa variabel bebas yang mempengaruhi variabel tak bebas dari suatu respon, serta bertujuan untuk mengoptimalkan suatu respon yang menggunakan data kuantitatif. Metode RSM berguna untuk menduga pengaruh linear kuadratik dan interaksi faktor antar variabel yang ada serta mengoptimalkan respons tersebut dengan menggunakan jumlah data percobaan yang minim. Metode permukaan respon merupakan metode rancangan percobaan yang dapat digunakan untuk pengembangan, peningkatan, dan pengoptimasian proses (Khuri dan Cornell, 1996).

Metode RSM memanfaatkan desain eksperimen dengan bantuan statistika untuk mencari nilai optimal dari suatu respon. Salah satu keuntungan metode ini adalah dapat memudahkan pencarian wilayah optimum dalam suatu percobaan. Terdapat dua bentuk persamaan dalam RSM yaitu persamaan fungsi berorde 1 dan fungsi berorde 2, untuk rancangan RSM berorde 2, rancangan percobaan bisa menggunakan CCD (Central Composite Design) ataupun BBD (Box Behnken Design). Model orde dua adalah model yang paling sering digunakan pada metode RSM. Alasannya yaitu model orde dua sangat fleksibel dan dapat berubah dalam bentuk fungsi sesuai kebutuhan, parameter orde dua mudah diestimasi serta model orde dua lebih praktis (Khuri dan Cornell, 1996).