



SINTESIS KITOSAN-ARGININ DENGAN KATALIS PIRIDIN DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI TERHADAP *Escherichia coli*

Candra Purnawan¹, Purwanto², T Martini¹, T Kusumaningtyas¹, AR Ambarrukmi¹

¹Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Sebelas Maret · ²Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret
Jl. Ir. Sutami 36 A, Kentingan Surakarta 57126 Telp. (0271) 63375

Info Artikel

Sejarah Artikel:
Diterima April 2014
Disetujui Mei 2014
Dipublikasikan Agustus 2014

Kata kunci:
antibakteri
Escherichia coli
kitosan-arginin
Optical Density (OD)
piridin

Abstrak

Telah dilakukan penelitian tentang sintesis kitosan-arginin dengan katalis piridin dan uji aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli*. Tujuan penelitian ini adalah mempelajari pengaruh penambahan massa arginin pada kitosan dan variasi suhu reaksi dalam sintesis kitosan-arginin terhadap aktivitas antibakteri *Escherichia coli* serta membandingkan kitosan dan kitosan-arginin terhadap aktivitas antibakteri *Escherichia coli*. Sintesis kitosan-arginin dilakukan dengan perbandingan massa (b/b) kitosan:arginin 1:0,5; 1:1; 1:1,25; 1:1,5; 1:2 dan variasi suhu reaksi 60, 80 dan 100°C menggunakan katalis piridin untuk mengaktifkan gugus karbonil arginin. Karakterisasi kitosan-arginin meliputi spektroskopi sinar infra merah (FT-IR), analisis termal (TGA-DTA) dan % nitrogen dengan metode Kjeldahl. Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode Optical Density (OD) λ_{maks} 600 nm pada jam ke-0, 3, 6, 9, 12, 24 dan 48. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan massa arginin dan variasi suhu reaksi sintesis kitosan-arginin tidak menunjukkan perbedaan signifikan terhadap daya hambat bakteri. Namun ketika aktivitas antibakteri kitosan jam ke-48 menurun, aktivitas antibakteri kitosan:arginin 1:1,5 pada 80°C masih meningkat.

Abstract

Has done research on the synthesis of chitosan-arginine with pyridine catalysts and test antibacterial activity against *Escherichia coli*. The purpose of this research is to study the effect of arginine on chitosan mass and temperature variations in the synthesis reaction of chitosan-arginine against *Escherichia coli* and the antibacterial activity of chitosan and chitosan compare-arginine to the antibacterial activity of *Escherichia coli*. Synthesis of chitosan-arginine is done with a mass ratio (w / w) chitosan: arginine 1: 0.5; 1: 1; 1: 1.25; 1: 1.5; 1: 2 and the variation of the reaction temperature 60, 80 and 100°C using pyridine catalysts to activate the carbonyl group of arginine. Characterization of chitosan-arginine using fourier transform infra red spectroscopy (FT-IR), thermal analysis (TGA-DTA) and % nitrogen by the Kjeldahl method. Antibacterial activity test using Optical Density (OD) λ_{max} 600 nm at time 0, 3, 6, 9, 12, 24 and 48 hours. The results showed that the addition of arginine mass and temperature variations of the synthesis reaction of chitosan-arginine showed no significant difference in the inhibition of bacteria.

Pendahuluan

Bakteri merupakan mikroorganisme yang tidak terlepas dari kehidupan manusia. Sebagian besar bakteri pada umumnya merugikan dan menimbulkan penyakit. Salah satu bakteri yang sering dijumpai adalah bakteri *Escherichia coli*. *Escherichia coli* bermanfaat untuk pembusukan makanan dalam usus manusia dan hewan. Namun keberadaan bakteri tersebut apabila melebihi dari jumlah normalnya dalam usus manusia bersifat patogen dan bakteri ini merupakan salah satu penyebab terjadinya keracunan pada makanan (Irianto; 2006).

Menurut Cai *et al.* (2009), Chung *et al.* (2011) dan Maharani *et al.* (2011), kitosan merupakan biopolimer alami yang bersifat non-toksik, *biodegradable*, dan *biocompatible* sebagai bahan antibakteri. Aktivitas antibakteri kitosan muncul karena adanya gugus amina bebas ($-NH_2$) pada struktur kitosan dan jumlah gugus amina tersebut (Zhao *et al.*; 2010). Dalam pH asam, gugus amina bebas terprotonasi menjadi gugus amina kationik ($-NH_3^+$) yang dapat berinteraksi dengan permukaan luar sel bakteri yang memiliki muatan negatif. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi jumlah gugus amina, maka aktivitas antibakterinya juga semakin tinggi.

Arginin adalah salah satu dari asam amino esensial yang memiliki gugus guanidin dan gugus amina dalam struktur rantainya. Turunan guanidin memiliki aktivitas antimikroba dan antifungal yang telah banyak diteliti dalam bidang kesehatan sebagai antiseptik untuk produk industri, makanan dan berbagai penggunaan lain dalam kehidupan sehari-hari (Zhao *et al.*; 2010). Adanya gugus guanidin dan gugus amina pada struktur arginin diharapkan dapat meningkatkan sifat kationik kitosan ketika arginin disubstitusikan pada gugus fungsional kitosan sehingga akan menghasilkan turunan kitosan yang bersifat polikationik sebagai bahan antibakteri.

Dalam penelitian ini, telah dilakukan sintesis kitosan-arginin dengan menggunakan katalis piridin untuk mengaktifkan gugus karboksilat arginin dan mempercepat reaksi. Penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan modifikasi kitosan-arginin yang dapat meningkatkan aktivitas antibakteri kitosan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

Metode Penelitian

Alat yang digunakan antara lain FT-IR

(Shimadzu, IR Prestige-21), XRD (Shimadzu, XRD-6000), TGA-DTA Linseis STA PT-1600, Autoclave (Tomy ES-315), Rotary Incubator (Infors HT Ecotron), Spektrofotometer UV-Vis (Perkin Elmer Lambda 25), Biosafety Laminer Air Flow (ESCO Class II BSC), Oven Memmert, Neraca Analitik AND GF-300, Hotplate IKA C-MAG HS 7, Seperangkat alat Kjeldahl dan refluks, ayakan 150 mesh (ASTM Standar). Micropipet (Brand), Blue tip (Brand) 1000 μ L, Jarum ose.

Bahan yang digunakan antara lain kitosan udang (Biotech Surindo), akuades (KMA), L-arginin, piridin, asam asetat glasial, luria bertani agar, Miller (LB Agar), luria bertani broth, Miller (LB Broth) dengan grade pro analyst buatan Merck, *Escherichia coli* ATCC 35218, alkohol 70% (One Med).

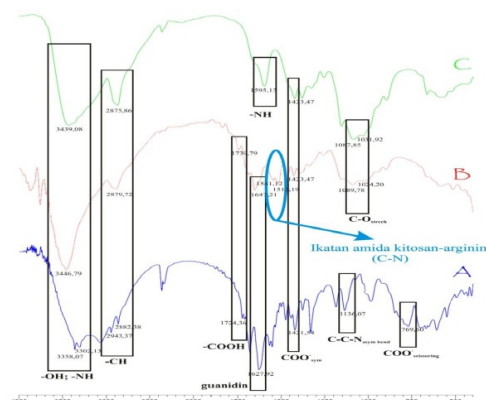
Sintesis kitosan-arginin disiapkan dengan modifikasi metode Lv *et al.* (2011). Pertama, kitosan dihaluskan dengan menggunakan blender, kemudian diayak dengan ayakan 150 mesh. Sebanyak 1,5 g kitosan dicampur ke dalam 120 mL akuades. Campuran didispersikan dengan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu kamar selama 15 menit. Kedua, sebanyak 0,75 g arginin dilarutkan ke dalam 30 mL akuades. Kemudian ditambahkan 2 tetes piridin yang berfungsi sebagai katalis untuk mengaktifkan gugus karbonil pada arginin. Arginin teraktivasi dicampur ke dalam kitosan terdispersi dengan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu kamar selama 30 menit dengan perbandingan massa (b/b) kitosan : arginin = 1:0,5; 1:1; 1:1,25; 1:1,5 dan 1:2 (modifikasi Lv *et al.*; 2011). Kemudian campuran direfluks pada suhu 60°C selama 4 jam. Hasil refluks didiamkan semalam dengan pengadukan pada suhu kamar, kemudian endapan yang terbentuk disaring dan dicuci hingga netral dengan akuades untuk menghilangkan arginin dan piridin yang tidak bereaksi. Selanjutnya serbuk netral dikeringkan dalam oven pada suhu 60°C. Analisis kitosan dan hasil sintesis kitosan-arginin menggunakan FT-IR, %N dengan metode Kjeldahl, XRD dan TGA-DTA.

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode *Optical Density* pada λ_{maks} 600 nm (Sezonov, *et al.*; 2007 dan Matlock, *et al.*; 2011) terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 35218. Sebanyak 0,05 gram sampel kitosan-arginin 1 % (b/v) hasil sintesis kitosan-arginin variasi massa (b/b) dan suhu dilarutkan ke dalam 50 mL asam asetat 0,5 %, dan ditambahkan 1 gram LB Broth 2,5 % (b/v), kemudian

disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Campuran yang terbentuk didinginkan dan ditambahkan 0,5 mL inokulum bakteri 1 % hasil inkubasi. Sampel uji diinkubasi pada suhu 37°C dengan kecepatan 150 rpm (Lahmer, *et al.*; 2012). Pengujian antibakteri dilakukan dengan mengukur absorbansi larutan sampel jam ke-0, 3, 6, 9, 12, 24 dan 48.

Hasil dan Pembahasan

Untuk mengetahui gugus fungsi arginin, kitosan-arginin dan kitosan dapat diketahui dengan analisis menggunakan spektroskopi sinar infra merah (FT-IR) yang ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Spektra FT-IR A.) arginin, B.) kitosan-arginin, C.) kitosan

Serapan karakteristik kitosan terdapat pada bilangan gelombang 3439,08 cm^{-1} yang merupakan vibrasi rentangan -OH tumpang tindih dengan rentangan -NH. Adanya gugus -OH dan -NH pada kitosan memungkinkan terbentuknya ikatan hidrogen intramolekuler dan intermolekuler. Serapan pada 2875,86 cm^{-1} menunjukkan adanya vibrasi rentangan -CH, sedangkan vibrasi tekuk -CH pada 1381,03 cm^{-1} . Vibrasi tekuk -NH terlihat pada bilangan gelombang 1595,13 cm^{-1} . Puncak lebar pada daerah 1087,85-1031,92 cm^{-1} merupakan vibrasi rentangan C-O_{stretch} yang merupakan vibrasi cincin piranosa (Dun Wan, *et al.*; 2007; Liu, *et al.*; 2004; Lv, *et al.*; 2011).

Arginin memiliki serapan karakteristik pada bilangan gelombang 1627,92 cm^{-1} yang merupakan vibrasi gugus guanidin. Serapan 1421,54 cm^{-1} menunjukkan adanya vibrasi tekuk COO_{sym}. Vibrasi tekuk C-C-N_{asym} dan COO_{sciss} masing-masing ditunjukkan pada bilangan gelombang 1136,07 dan 769,60 cm^{-1} .

Penambahan arginin ke dalam rantai kitosan menyebabkan terbentuknya puncak baru pada bilangan gelombang 1541,12 dan 1512,19 cm^{-1} yang merupakan ikatan amida yang

menghubungkan gugus amina kitosan dengan gugus karbonil arginin (Liu, *et al.*; 2004 dan Lv, *et al.*; 2011).

Analisis kestabilan termal kitosan dan kitosan-arginin menggunakan *thermogravimetric analysis* (TGA) dan *differensial thermal analysis* (DTA). Data perkiraan suhu dan persentase penurunan massa pada kitosan dan kitosan-arginin disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Data perkiraan suhu dan persentase penurunan massa pada kitosan dan kitosan-arginin

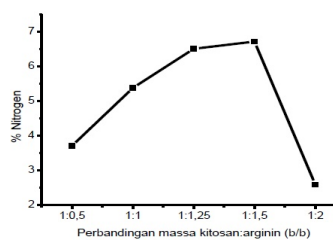
Perubahan Massa	Kitosan		Kitosan-Arginin	
	Suhu (°C)	Massa (%)	Suhu (°C)	Massa (%)
I	< 120,43	12,52	< 166,56	14,32
II	263,15-311,25	29,8	275,59-320,85	29,39
III	311,25-637,63	49,92	320,85-615,59	49,74
IV	> 637,63	0,61	615,59	0,43

Daerah perubahan kedua menunjukkan suhu antara 263,15-311,25°C untuk kitosan dan 275,59-320,85°C untuk kitosan-arginin. Rentang suhu ini menunjukkan lepasnya gugus asetil (-COCH₃) yang masih terdapat pada kitosan. Gugus asetil memiliki ikatan π sehingga ikatannya lebih lemah dan terdegradasi lebih awal dibandingkan arginin kitosan. Lepasnya gugus asetil ini merupakan reaksi endotermis yang ditunjukkan pada termogram DTA (Purnawan; 2008). Sedangkan untuk kitosan-arginin, rentang tersebut merupakan degradasi kitosan-arginin bersamaan dengan lepasnya ikatan amida yang menghubungkan gugus amina kitosan dan gugus karbonil arginin. Hal ini sesuai dengan penelitian Xiao, *et al.* (2011) yang menunjukkan putusnya ikatan amida tersebut pada rentang suhu 200-280°C.

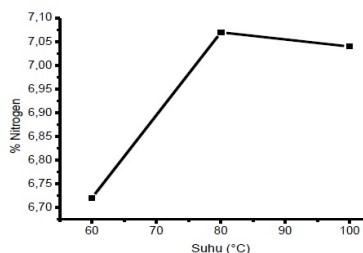
Pengaruh penambahan massa arginin dalam kitosan dilakukan untuk memperoleh kondisi optimum pembentukan kitosan-arginin dalam sintesis berdasarkan %N. Kadar nitrogen yang diperoleh dari perbandingan kitosan: arginin 1:0,5; 1:1; 1:1,25; 1:1,5 dan 1:2 masing-masing adalah 3,71; 5,38; 6,51; 6,72 dan 2,59%. Nilai %N yang dihasilkan semakin meningkat dengan penambahan massa arginin yang semakin banyak. Hal ini disebabkan kemungkinan tumbukan antara molekul arginin dan gugus amina kitosan semakin tinggi, sehingga substitusi arginin dalam rantai kitosan meningkat. Nilai %N hasil sintesis kitosan-arginin disajikan pada Gambar 2.

Berdasarkan hasil %N hasil sintesis variasi massa diperoleh %N optimum pembentukan kitosan-arginin pada perbandingan kitosan: arginin 1:1,5. Pada perbandingan tersebut dilakukan variasi suhu reaksi sintesis kitosan-

arginin. Kenaikan suhu reaksi akan meningkatkan laju difusi monomer (arginin) ke dalam rantai kitosan (Wiyarsi; 2008). Hal ini disebabkan kenaikan suhu reaksi akan meningkatkan frekuensi tumbukan antar molekul, sehingga memungkinkan terjadinya substitusi arginin dalam rantai kitosan. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Lv, *et al.* (2011), substitusi arginin dalam kitosan dilakukan pada suhu kamar selama 48 jam. Adanya pengaruh suhu yang lebih tinggi diharapkan waktu yang dibutuhkan dalam sintesis kitosan-arginin lebih singkat. Kadar nitrogen yang diperoleh dari sintesis variasi suhu reaksi 60, 80 dan 100°C masing-masing adalah 6,72; 7,07 dan 7,04%. Nilai %N yang dihasilkan optimum pada suhu 80°C dan mulai mengalami penurunan pada suhu 100°C. Hal ini disebabkan adanya degradasi rantai polimer dengan kenaikan suhu tinggi yang menyebabkan substitusi arginin dalam kitosan lebih kecil dibandingkan dengan degradasi rantai polimer. Hasil sintesis dengan pengaruh suhu reaksi terhadap %N disajikan dalam Gambar 3.



Gambar 2. %N sintesis kitosan-arginin dengan variasi massa

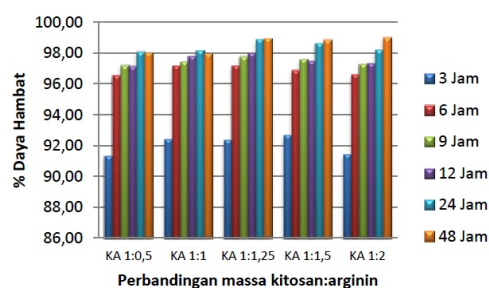


Gambar 3. %N sintesis kitosan-arginin dengan variasi suhu

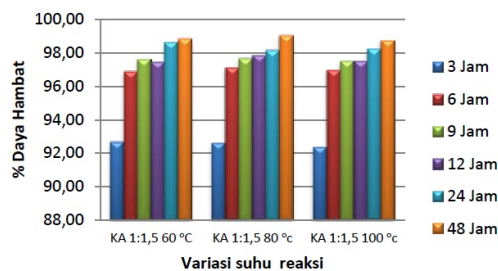
Pengujian antibakteri dilakukan untuk mengetahui pengaruh penambahan arginin pada kitosan dan variasi suhu reaksi dalam sintesis kitosan-arginin terhadap aktivitas antibakteri serta membandingkan aktivitas antibakteri kitosan dan hasil sintesis kitosan-arginin. Besarnya aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan persentase daya hambat bakteri.

Persentase daya hambat bakteri hasil pengujian berdasarkan variasi massa arginin dan variasi suhu reaksi secara umum memiliki

aktivitas antibakteri yang optimum yaitu > 90%, dimana semakin lama waktu pengujian aktivitas antibakteri yang dihasilkan semakin tinggi. Kemampuan antibakteri sampel hasil sintesis mengalami peningkatan pada waktu kontak 6, 9, 12, 24 dan 48 jam. Hal ini disebabkan bahan antibakteri membutuhkan waktu tertentu untuk berinteraksi dengan bakteri kemudian menghambat pertumbuhan bakteri (efek bakteriostatik) dan membunuh bakteri (efek bakteriosidal). Namun kenaikan daya hambat tersebut menunjukkan hasil yang tidak berbeda signifikan terhadap pengujian antibakteri. Hal tersebut dimungkinkan karena substitusi arginin dalam gugus amina kitosan pada sintesis kitosan-arginin memiliki perbedaan yang kecil berdasarkan pengujian kadar nitrogen dengan metode Kjeldahl. Nilai daya hambat bakteri terhadap penambahan massa arginin dan variasi suhu reaksi masing-masing ditunjukkan pada Gambar 4 dan 5.



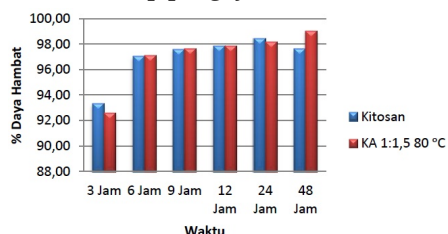
Gambar 4. %Daya hambat hasil sintesis kitosan-arginin variasi massa



Gambar 5. %Daya hambat hasil sintesis kitosan-arginin variasi suhu

Perbandingan aktivitas antibakteri kitosan dan kitosan:arginin (1:1,5) pada suhu 80°C ditunjukkan pada Gambar 6. Aktivitas antibakteri kitosan pada jam ke-3, 6, 9, 12, 24 dan 48 menunjukkan persen daya hambat 93,32; 97,06; 97,60; 97,86; 98,42 dan 97,65%, sedangkan kitosan:arginin 1:1,5 pada suhu 80°C menunjukkan persen daya hambat 92,60; 97,10; 97,67; 97,83; 98,17 dan 99,04% (berturut-turut). Hal ini menandakan bahwa aktivitas antibakteri meningkat seiring dengan peningkatan waktu pengujian. Pada jam ke-48 aktivitas antibakteri kitosan mengalami penurunan, sedangkan

kitosan:arginin 1:1,5 pada suhu 80°C mengalami peningkatan lebih tinggi dibandingkan dengan kitosan. Namun kenaikan daya hambat tersebut menunjukkan hasil yang tidak berbeda signifikan terhadap pengujian antibakteri.



Gambar 6. %Daya hambat kitosan dan kitosan:arginin

Simpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan: (1) nilai %Nitrogen hasil sintesis kitosan-arginin cenderung mengalami kenaikan dan optimum pada perbandingan kitosan:arginin 1:1,5 suhu 80°C, (2) penambahan massa arginin pada kitosan dan variasi suhu reaksi menunjukkan hasil tidak berbeda signifikan terhadap pengujian aktivitas antibakteri, dan (3) pada jam ke-48 aktivitas antibakteri kitosan mengalami penurunan, sedangkan kitosan:arginin 1:1,5 pada 80°C mengalami peningkatan lebih tinggi dibandingkan dengan kitosan.

Ucapan Terima kasih

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada DIKTI yang telah mendanai penelitian ini melalui Penelitian Unggulan Madya 2013 Universitas Sebelas Maret (UNS), Surakarta.

Daftar Pustaka

Au, H.T., Pham, L.N., Vu, T.H.T. dan Park, J.S. 2012. Fabrication of An Antibacterial Non-Moven Mat of Poly(lactic acid)/Chitosan Blend by Electrospinning. *Journal Macromolecular Research*. Vol. 20 (1):51-58

Cai, Z.S., Song, Z.Q., Yang, C.S., Shang, S.B., Yin, Y.B. 2009. Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity of Quaternized N,O-(2-carboxyethyl) Chitosan. *Journal of Polym. Bull.* 62: 445-456

Chung, Y.C., Yeh, J.Y., Tsai, C.F. 2011. Antibacterial Characteristics and Activity of Water-Soluble Chitosan Derivatives Prepared by the Maillard Reaction. *Journal of Molecules*. 16. 8504-8514

DunWan, Z., Hailing, Z., J.G. Bai., W.G. Liu., X.G. Leng., C.X. Song., Jian, Y., X.W. Li., Xu, J., L.P. Song., L.X. Liu., X.L. Li., Yang, Z., K.D. Yao. 2007. Enhancement of Transfection Efficiency for HeLa Cells Via Incorporating Arginine Moiety into Chitosan. *Journal of Chinese Science Bulletin*. December. Vol. 52 No. 23. 3207-3215

Irianto, K. 2006. *Mikrobiologi: Menguk Dunia Mikroorganism*. Bandung: CV. Irama Widya.

Lahmer, R.A., Williams A.P., Townsend, S., Baker, S. Dan Jones, D.L. 2012. Antibacterial Action of Chitosan-Arginine againts *Escherichia coli* O157 in Chicken Juice. *Journal Food Control*. 26: 206-211

Lehninger, A. 1990. *Dasar-dasar biokimia*/Albert L. Lehninger: alih bahasa Maggy Thenawidaja. Jakarta: Erlangga

Liu, W.G., Zhang, J.R., Cao, Z.Q., Xu, F.Y., Yao, K.D. 2004. A Chitosan-Arginine Conjugate as a Novel Anticoagulation Biomaterial. *Journal of Material Science: Materials in Medicine*. 15: 1199-1203

Lv, H.X., Zhang, Z.h., Wang, X.P., Cheng, Q.Q., Wang, W., Huang, X.H., Zhou, J.p., Zhang, Q., Hou, L.L., Huo, W. 2011. A Biomimetic Chitosan Derivatives: Preparation, Characterization and Transdermal Enhancement Studies of N-Arginine Chitosan. *Journal of Molecules*. 16. 6778-6790

Maharani, D.K., K, Indriana., A., Nurul H. 2011. Efektifitas Nano Komposit Kitosan-Epoksi Silika sebagai Bahan Antibakteri Ramah Lingkungan pada Tekstil. *Journal of Berk. Penel. Hayati edisi Khusus*: 6C: 15-18

Matlock, B.C., Beringer, R.W., Ash, D.L., Page, A.F., Scientific, T.F., Walmington., DE. USA. Allen, M.W. dan Scientific, T.F., Madison, WI. USA. 2011. Differences in Bacterial Optical Density Measurements between Spectrophotometers. *Journal of Thermo Scientific*.

Candra, P., 2008. *Kitosan dari Cangkang Udang dan Aplikasi Kitosan sebagai bahan Antibakteri pada Kain Katun*. Yogyakarta: Tesis. Universitas Gadjah Mada

Sezonov, G., Petit, D.J. dan D'Ari, R. 2007. *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. *Journal of Bacteriology*. Vol. 189. (23): 8746-8749

Wiyarsi, A. 2008. *Sintesis Derivat Kitosan-Vanilin dan Aplikasinya Sebagai Agen Antibakteri Pada Kain Katun*. Yogyakarta: Sekolah Pascasarjana, Program Studi Ilmu Kimia Universitas Gadjah Mada

Xiao, B., Wan, Y., Zhao, M., Liu, Y., Zhang, S. 2011. Preparation and Characterization of Antimicrobial Chitosan-N-Arginine with Different Degrees of Substitution. *Journal of Carbohydrate Polymers*. 83: 144-150

Zhao, X., Qiao, Z.Z., He, J.X. 2010. Preparation of Chitosan Biguanidine Hydrochloride ang Application in Antimicrobial Finish of Wool Fabric. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*. Volume 5. issue 3