

PEMANFAATAN CHITOSAN LARUT AIR SEBAGAI ANTISEPTIK *HAND SANITIZER*

UTILIZATION OF WATER-SOLUBLE CHITOSAN AS ANTISEPTIC HAND SANITIZER

Chamidah, A., Widiyanti, Ch. H. dan Fabiyani, N. N.

Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan

Universitas Brawijaya

achamidah@ub.ac.id

ABSTRACT

Shrimp wastes produced by manufacturers are mostly limited to be utilized by small industries. They only can turn the waste into chips and shrimp pastes even though it can be used as chitosan. The scarcity of shrimp waste utilized as chitosan is often constrained due to the lack of chitosan dissolve in water caused by the length of the molecular chain. In order to optimize the chitosan utilization, depolymerization is used; such as using H₂O₂. Chitosan depolymerization enables chitosan to be water soluble and has a high antibacterial ability, which can be applied as an antiseptic of hand sanitizer which has been derived from synthetic materials. The used method is an experimental method which includes the processing of making water-soluble chitosan with test parameters of deacetylation, solubility, moisture content, and yield. Furthermore, the manufacture of hand sanitizers is carried out *in vitro* and *in vivo*. The results showed that water-soluble chitosan can be made at 13% H₂O₂ concentration at 40°C with deacetylation degree 94.21%, 90% solubility, 10.60% moisture content and 3.5% yield. Moreover, after becoming a hand sanitizer, it was able to inhibit *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria at concentrations of 120 mg/ml, respectively 19.53 mm and 21.12 mm, which were relatively strong. Resulted in MIC values 0.28% and 0.27%, and MBC values 1.12% and 1.08%, and also without causing irritation or edema on mouse skin

Keywords: Chitosan water soluble, Hand sanitizer, *in vivo*, *in vitro*

ABSTRAK

Limbah udang yang diproduksi oleh industri pengolahan pemanfaatannya oleh home industry kecil masih sangat terbatas, seperti dibuat menjadi kerupuk, petis dan pakan ternak meskipun limbah ini dapat dibuat sebagai chitosan. Pemanfaatan chitosan sering terkendala karena chitosan tidak larut dalam air yang disebabkan oleh panjangnya rantai molekuler. Untuk mengoptimalkan pemanfaatan chitosan, perlu dilakukan depolimerisasi misalnya menggunakan H₂O₂. Depolimerisasi kitosan memungkinkan kitosan menjadi larut dalam air dan memiliki kemampuan antibakteri yang tinggi, yang dapat digunakan sebagai antiseptik pembersih tangan yang umumnya dibuat dari bahan sintesis. Metode yang digunakan adalah metode eksperimental yang meliputi pembuatan chitosan yang larut dalam air dengan parameter uji deasetilasi, kelarutan, kadar air, dan rendemen. Selanjutnya pembuatan hand sanitizer yang diuji secara *in vitro* dan *in vivo*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa chitosan larut air dapat dibuat pada konsentrasi H₂O₂ 13% pada 40°C dengan nilai DD 94,21%, kelarutan 90%, kadar air 10,60% dan rendemen 3,5%. Setelah menjadi hand sanitizer mampu menghambat bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 120 mg / ml, dengan zona bening masing-masing 19,53 mm dan 21,12 mm, yang tergolong kuat. Menghasilkan nilai MIC 0,28% dan 0,27%, dan nilai MBC 1,12% dan 1,08%, dan tanpa menyebabkan iritasi atau edema pada kulit tikus.

Kata kunci: Chitosan larut air, Hand sanitizer, *in vivo*, *in vitro*

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan pengeksportir udang terbesar ketiga di dunia. Umumnya ekspor udang dalam bentuk tanpa kepala atau tanpa kulit, menyisakan limbah pengolahan udang yang tinggi (30-40 %, terdiri dari kulit, kepala dan ekor) yang dapat menimbulkan masalah pencemaran lingkungan bila tidak diolah dengan benar (Andriana *et al.*, 2001). Pemanfaatan limbah udang selama ini masih belum optimal, hanya sebagai pakan, petis dan kerupuk yang bernilai ekonomi rendah. Pemanfaatan lain limbah kulit udang, dapat dijadikan bahan untuk pembuatan chitin dan chitosan (Nandes, 2011).

Kulit udang mengandung protein sebesar 25-40 %, chitin 20-30 % dan kalsium karbonat 45-50 % (Domepepen *et al.* 2016). Chitin adalah polimer linier dengan rantai panjang tanpa rantai samping yang tersusun atas 2-asetamido-2-deoksi- β -D-glukosa yang berikatan glikosidik 1-4 (Nadarajah, 2005). Sedangkan chitosan terbentuk ketika beberapa gugus asetil dihilangkan dari chitin melalui proses deasetilasi parsial (Savant *et al.*, 2000). Senyawa ini merupakan polisakarida yang dibentuk dari N-asetil-2-amino-2-deoksi-D-glukosa melalui ikatan β -(1,4) glikosida (Savant *et al.*, 2000). Chitosan mempunyai reaktivitas lebih tinggi daripada chitin karena memiliki gugus amina bebas yang bersifat nukleofil kuat. Hal ini menyebabkan chitosan lebih sering diaplikasikan dalam dunia industri (Marganov, 2003).

Chitosan larut dalam pelarut organik (asam format, asam asetat, asam tartarat dan asam sitrat) pada pH kurang dari 6,5 (Tiyaboonchai, 2003). Lebih lanjut Sugita (2009), kelarutan chitosan yang paling baik dalam larutan asam asetat 2% yang dipengaruhi oleh derajat deasetilasi dan rotasi spesifiknya. Tanasale *et al.* (2016) menyatakan bahwa bobot molekul yang tinggi dan panjangnya rantai chitosan yang mengakibatkannya sulit larut air. Disisi lain, kelarutan merupakan karakteristik penting untuk pemanfaatan chitosan (Tanasale *et al.*, 2016). Keterbatasan kelarutan chitosan menyebabkan pemanfaatannya kurang optimal. Oleh karena itu, perlu dilakukan modifikasi dengan memutus rantai chitosan. Salah satu metode depolimerisasi menurut Tanasale *et al.* (2016) dengan menggunakan H_2O_2 .

Depolimerisasi ditentukan oleh konsentrasi dan suhu larutan H_2O_2 (Makuuchi, 2008). Suhu yang semakin meningkat akan mempercepat proses depolimerisasi rantai utama chitosan sehingga BM chitosan yang dihasilkan menurun. Semakin rendah BM chitosan maka tingkat kelarutannya semakin meningkat (Tanasale *et al.* 2016). Ditambahkan Du *et al.* (2002) semakin tinggi konsentrasi H_2O_2 dapat mempercepat proses degradasi rantai utama chitosan dan juga mengakibatkan perubahan struktur kimia, seperti pembentukan ikatan karboksil.

Chitosan larut air menurut Liu *et al.* (2001) efektif sebagai antibakteri dibandingkan dengan chitosan alami, karena chitosan larut air memiliki derajat deasetilasi (DD) yang tinggi dan BM yang rendah. Semakin tinggi DD cenderung memiliki aktivitas antibakteri yang lebih kuat. Antibakteri adalah senyawa biologis atau kimia yang dapat mengganggu pertumbuhan dan aktivitas bakteri, khususnya bakteri yang merugikan manusia. Lebih lanjut Chotiah (2013) menyatakan bahwa antibakteri dapat digunakan sebagai pencegahan terhadap berbagai infeksi bakteri patogen seperti *Escherichia coli* dan *Staphylococcus epidermidis* (Purwantoro *et al.* 2010).

Dengan demikian perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pemanfaatannya sebagai zat antibakteri, serta pengaplikasiannya menjadi *hand sanitizer*, yaitu salah satu bentuk antiseptik yang banyak digunakan di masyarakat untuk membersihkan tangan dari bakteri. Tujuan Penelitian ini adalah mengevaluasi kemampuan chitosan larut air sebagai antibakterial sekaligus pengaplikasiannya sebagai hand sanitizer.

MATERI DAN METODE

Bahan baku dan bahan pembantu

Chitosan dari udang *vaname*, aquadest, HCl 92%, NaOH 99%, H₂O₂ 50%, asam asetat glasial, *cotton swap*, metal parabean, polysorbate 20, trietanolamin (TEA), koragen odoris, eter (sigma), Natrium Agar, Mueller Hinton Agar, Natrium Broth (Oxoid), tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*), air, tissu, kertas label, plastik wrap, kain blacu, kertas saring, aluminium foil, kasa, plastik, dan spirtus.

Parameter uji

Derajat deasetilasi, kelarutan, kadar air dan randemen, penentuan daya hambat (zona bening), MIC dan MBC metode Bloomfield dan pengujian *in vivo* iritasi permanen.

Jalannya Penelitian

Penelitian ini dimulai dengan pembuatan chitosan larut air menggunakan chitosan alami dengan kombinasi perlakuan konsentrasi H₂O₂ (3,7,10 dan 13%) dan suhu pemanasan (40, 47,5 dan 55°C) yang diulang sebanyak 3 kali. Kemudian diuji rendemen, DD dan kadar air serta tingkat kelarutannya. Hasil chitosan larut air terbaik diuji kemampuannya sebagai anti bacterial terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan melihat zona hambat terbesar dan MIC serta MBCnya. Kombinasi perlakuan terbaik digunakan untuk membuat formulasi hand sanitizer kemudian diuji zona hambat, MIC, MBC serta daya iritasinya. Untuk memudahkan dibuat diagram alir seperti terlihat pada Gambar 1. diatas

HASIL DAN PEMBAHASAN

Derajat Deasetilasi

Derajat deasetilasi (DD) adalah karakteristik penting karena dapat mempengaruhi kualitas chitosan larut air (Bahri *et al.*, 2015). Lebih lanjut Knorr (1982) menyatakan bahwa DD merupakan parameter mutu chitosan yang menunjukkan persentase gugus asetil yang dapat dihilangkan dari rendemen chitin maupun chitosan. Hasil uji Anova DD terdapat interaksi antara suhu dan konsentrasi yang berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap kitosan larut air yang dihasilkan, seperti terlihat pada Tabel 1.

Berdasarkan Tabel 1, semakin tinggi suhu pemanasan pada konsentrasi H₂O₂ yang sama terjadi penurunan nilai DD. Hal ini karena suhu yang terlalu tinggi dapat menurunkan tingkat kelarutan termasuk kualitas kitosan larut air (Tanasale *et al.*, 2006). Sebaliknya dengan konsentrasi H₂O₂ yang semakin tinggi nilai DD semakin tinggi, hal ini disebabkan karena H₂O₂ dapat mempercepat proses degradasi rantai utama chitosan (Du *et al.*, 2002), sehingga gugus asetil yang terdapat pada chitosan larut air menurun dan semakin banyak jumlah gugus amina. Semakin tinggi DD, maka gugus asetil dari chitosan semakin rendah sehingga interaksi antar ion dan ikatan hidrogennya akan semakin kuat. Pelepasan gugus asetil dari chitosan menyebabkan chitosan bermuatan positif sehingga mampu mengikat senyawa bermuatan negatif (Rochima, 2007). Nilai DD tertinggi pada perlakuan K4T1 dengan konsentrasi H₂O₂ 13% dan suhu 40°C sebesar 94,21% Nilai DD chitosan larut air lebih besar dibandingkan chitosan alami yaitu 75%. (Islam *et al.*, 2011) dan 74,26% (Basmal *et al.*, 2007).

Kelarutan

Kelarutan merupakan parameter yang dapat dijadikan standart penilaian mutu chitosan, termasuk chitosan larut air. Semakin tinggi kelarutan maka aplikasinya akan semakin luas. Hasil uji Anova kelarutan menunjukkan bahwa suhu dan konsentrasi berpengaruh nyata ($p < 0,05$)

terhadap chitosan larut air yang dihasilkan. Berdasarkan Tabel 1. diatas, semakin tinggi suhu pemanasan pada konsentrasi H_2O_2 yang sama terjadi penurunan kelarutan. Konsidi ini disebabkan karena suhu yang terlalu tinggi dapat merusak chitosan dan menurunkan nilai DD. Menurut Trimulyadi (2013), semakin tinggi DD maka semakin banyak gugus asetil yang berubah menjadi gugus amina sehingga mengurangi ikatan hidrogen antara gugus asetil dan hidroksil. Demikian juga konsentrasi H_2O_2 semakin tinggi, maka kelarutannya semakin naik. Hal ini disebabkan karena konsentrasi H_2O_2 yang tinggi dapat menyebabkan semakin kecilnya BM. H_2O_2 merupakan oksidator kuat yang dapat memutus ikatan glikosidik pada chitosan, sehingga BM chitosan semakin rendah, semakin rendah BM maka semakin tinggi kelarutannya. Hasil analisis menunjukkan kelarutannya tertinggi pada perlakuan K4T1 sebesar 94%, yang lebih besar dibandingkan chitosan alami yaitu 82,91% (Purbowati, 2016), dan pada karboksimetil chitosan sebesar 0,00198% (Kurniasih *et al.*, 2016).

Kadar Air

Kadar air (KA) merupakan parameter penting untuk menentukan mutu chitosan. Hasil uji kadar air chitosan larut air menunjukkan suhu dan konsentrasi H_2O_2 berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap chitosan larut air yang dihasilkan. Berdasarkan Tabel 1. diatas semakin tinggi suhu dan konsentrasi H_2O_2 maka kadar air chitosan larut air semakin tinggi. Hal ini disebabkan chitosan memiliki sifat higroskopis sehingga mudah menyerap uap air dari udara disekitarnya (Dompeipen *et al.*, 2016). Air yang terkandung dalam chitosan terikat pada gugus fungsional polimer chitosan, terutama gugus amina, N-asetil dan hidroksil melalui ikatan hidrogen. Saleh *et al.* (1994) menyatakan bahwa KA juga dipengaruhi oleh proses pengeringan, lama pengeringan, luas permukaan dan jumlah chitosan larut air yang dikeringkan. KA terendah terdapat pada K1T1 (H_2O_2 3% dan 40 °C) sebesar 6,6% dan tertinggi pada perlakuan K4T3 (H_2O_2 10% dan 55 °C) sebesar 12,80%. Standart mutu chitosan terhadap KA adalah $\leq 10\%$ (Bastaman, 1989). kadar air chitosan larut air ini lebih rendah dibandingkan chitosan alami sebesar 8,91% (Zahiruddin *et al.*, 2008), karboksimetil chitosan sebesar 9,8% (Basmal *et al.* 2007).

Rendemen

Rendemen merupakan presentase rasio antara hasil produk akhir terhadap bahan baku awal yang digunakan (Yudihapsari, 2009), yaitu rendemen transformasi chitosan menjadi chitosan larut air berdasarkan presentase berat chitosan larut air terhadap berat chitosan yang diperoleh (Zahiruddin *et al.* 2008). Hasil Hasil Anova rendemen menunjukkan suhu dan konsentrasi berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap chitosan larut air yang dihasilkan.

Berdasarkan Tabel 1. semakin tinggi suhu pemanasan dan konsentrasi H_2O_2 rendemen yang diperoleh mengalami penurunan. Hal ini karena semakin tinggi konsentrasi H_2O_2 menyebabkan BM chitosan semakin rendah. Hong *et al.* (1989) menyatakan H_2O_2 yang tinggi dapat menyebabkan depolimerisasi rantai molekul chitosan yang akhirnya akan menyebabkan penurunan BM. Demikian juga suhu yang terlalu tinggi dapat mengakibatkan partikel-partikel chitosan yang larut air menjadi lebih halus sehingga saat pemisahan filtrat dan residu banyak yang terikut pada filtratnya (Apriani *et al.* 2012). Rendemen tertinggi pada perlakuan K1T1 sebesar 5,61% dan terendah pada perlakuan K4T3 sebesar 0,27%, nilai ini lebih kecil dibandingkan chitosan alami 15,26% (Zahiruddin *et al.*, 2008) dan karboksimetil chitosan yaitu 129,4% (Basmal *et al.*, 2007).

Dari hasil uji indeks efektifitas deGarmo untuk menentukan perlakuan yang layak digunakan sebagai antibakterial diperoleh perlakuan terbaik adalah perlakuan K4T1 (Konsentrasi H_2O_2 13% dengan suhu 40 °C). Sehingga digunakan sebagai sampel yang diujikan terhadap bakteri patogen. Adapun bakteri yang digubakan adalah *S. epidermidis* dan *E. coli*.

Uji Aktivitas Antibakteri Chitosan larut Air

a. Metode Difusi

Uji Aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode sumuran untuk mengukur besarnya diameter zona hambat yang dapat dilihat dari besarnya zona bening yang terbentuk disekiran lubang sumuran. Metode ini digunakan karena menurut Azwar dan Agoes (2010), dapat berdifusi maksimal sampai ke dasar media. Ditambahkan Setiawan (2006), metode sumuran dapat menghasilkan zona bening yang lebih besar dan lebih kuat untuk menghambat bakteri. Berdasarkan analisa statistik pengguna suhu dan konsentrasi H₂O₂ pada pengujian aktivitas antibakteri menunjukkan hasil berbeda nyata ($p < 0.05$). Hasil rerata diameter zona hambat pada bakteri dapat dilihat pada Tabel 2. dan 3. dan Gambar 2. dan 3.

Diameter zona hambat chitosan larut air tertinggi pada konsentrasi 120 mg/ml, yaitu $19,53 \pm 0,46$ mm pada bakteri *E. coli* yang dikategorikan kuat, sedangkan untuk bakteri *S. epidermidis* sebesar $21,12 \pm 0,85$ mm yang dikategorikan sangat kuat. Dari Tabel 2. dan 3. menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi chitosan larut air, menghasilkan zona hambat yang semakin besar. Hal ini didukung oleh Pelczar and Chan (2010), semakin tinggi konsentrasi suatu bahan antibakteri maka aktivitas antibakterinya semakin kuat pula. Kontrol negatif menggunakan aquadest tidak terdapat zona hambat pada kedua bakteri.

Pada konsentrasi yang sama, diameter zona hambat bakteri *E. coli* (gram negatif) < *S. epidermidis* (gram positif). Perbedaan ini disebabkan karena perbedaan struktur dinding selnya. Pelczar dan Chan (2010), menyatakan bahwa struktur penyusun dinding sel bakteri gram negatif lebih kompleks dan berlapis tiga (lipoprotein pada lapisan luar, peptidoglikan di tengah dan lipopolisakarida dibagian dalam) sehingga mempersulit senyawa antibakteri masuk ke dalam selnya, menyebabkan zona bening yang dihasilkan lebih kecil. Struktur bakteri gram negatif lebih tebal (15-80 nm) sedangkan bakteri gram positif tipis (10-15 nm) (Pelczar and Chan, 1986). Kitosan larut air memiliki BM yang rendah dan DD yang tinggi, didukung dengan konsentrasi yang tinggi sehingga menghasilkan diameter zona hambat yang besar. Menurut Oh *et al.* (2001), faktor utama yang mempengaruhi aktivitas antibakteri adalah BM dan DD chitosan larut air. Didukung Tsai *et al.* (2004), BM chitosan juga mempengaruhi aktivitas antibakteri, semakin rendah BM chitosan maka aktivitas antibakterinya semakin baik. Ditambahkan Park *et al.* (2004), chitosan larut air dengan DD 90% memiliki aktivitas antibakteri yang lebih efektif dibandingkan dengan yang memiliki DD < 70%. Dalam penelitian ini nilai DD chitosan larut air 95,85% , menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri yang lebih tinggi melawan bakteri *E. coli* dan *S. epidermidis*.

Mekanisme chitosan larut air sebagai antibakteri menurut Helander *et al.* (2001), dengan cara merusak perlindungan membran luar bakteri, terutama bakteri gram negatif karena dinding sel bakteri gram negatif lebih kompleks dan berlapis dibandingkan dengan bakteri gram positif. Senyawa ini menyebabkan terjadinya perubahan pada permukaan sel serta menutupi membran luar bakteri, sehingga fungsi barrier dari membrane sel hilang. Ditambahkan Killay (2013) menyatakan bahwa afinitas antimikroba dari chitosan tergantung dari BM dan DD, oleh karena itu BM dan DD yang lebih besar menunjukkan aktifitas antibakteri yang lebih besar. Kontrol positif dalam penelitian ini menggunakan amoksisilin. Mekanisme kerja amoksisilin, yaitu menghambat sintesis protein dengan mencegah terikatnya tRNA di ribosom (Jawetz *et al.*, 2001; Tenover, 2006),.

b. Metode Dilusi

Uji aktivitas antibakteri chitosan larut air juga dilakukan untuk menentukan MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*). MIC adalah konsentrasi minimum senyawa antibakteri yang masih dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Sedangkan MBC (kelanjutan dari MIC), merupakan konsentrasi terendah yang dapat membunuh bakteri. Uji keduanya menggunakan metode Bloomfield (1991), seperti terlihat pada Tabel 4.

Berdasarkan Tabel 4. nilai MIC dari chitosan larut air terhadap *E. coli* sebesar 0,28 mg/ml, yang berarti pada konsentrasi tersebut senyawa ini mampu menghambat pertumbuhan *E. coli*. Sedangkan nilai MBCnya sebesar 1,12 mg/ml yang berarti pada konsentrasi tersebut senyawa ini mampu membunuh *E. coli*. Semakin rendah nilai MIC dan MBC, maka kemampuan suatu ekstrak untuk menghambat dan membunuh suatu bakteri semakin tinggi (Wei *et al.*, 2011). Dibandingkan dengan MIC dan MBC chitosan alami masing-masing sebesar 1,3 mg/ml dan 1,7 mg/ml (Islam *et al.*, 2001) maka nilai MIC dan MBC kitosan larut air lebih rendah, dengan demikian kemampuan senyawa ini untuk menghambat dan membunuh bakteri lebih tinggi.

S. epidermidis mempunyai nilai MIC sebesar 0,27 mg/ml yang berarti pada konsentrasi tersebut chitosan larut air mampu menghambat pertumbuhan *S. epidermidis*. Sedangkan MBC nya sebesar 1,08 mg/ml yang berarti senyawa ini pada konsentrasi tersebut sudah mampu membunuh *S. epidermidis*. Dibandingkan kitosan alami dengan nilai MIC dan MBC masing-masing 0,75 mg/ml dan 1,76 mg/ml (Safitri, 2016), maka chitosan larut air dengan konsentrasi lebih rendah sudah dapat menghambat dan membunuh *S. epidermidis*. Semakin rendah konsentrasi sebuah antibiotik terhadap suatu mikroba menurut Pramata (2005), maka sensitivitas dari bakteri akan semakin besar. *E. coli* dan *S. epidermidis* memiliki tingkat sensitivitas yang berbeda terhadap chitosan larut air. Bakteri *E. coli* lebih resisten daripada *S. epidermidis*, hal ini disebabkan *E. coli* merupakan bakteri gram negatif yang memiliki dinding sel lebih kompleks.

Uji Antibakteri Hand sanitizer Chitosan Larut Air

Uji antibakteri *hand sanitizer* chitosan larut air terhadap *S. aureus* menghasilkan zona bening sebesar 11,13 – 14,45 mm, sedangkan terhadap *E. coli* sebesar 7,73 – 9,38 mm. Hasil analisa data menunjukkan bahwa antibakteri *hand sanitizer* chitosan larut air terhadap *S. aureus* maupun *E. coli* berbeda nyata ($P < 0,05$). Zona hambat *hand sanitizer* konsentrasi terbaik terhadap *S. aureus* dan *E. coli* menggunakan *hand sanitizer* chitosan larut air dengan Formula F0, F1 (110 mg/ml), F2 (120 mg/ml), F3 (130 mg/ml), F4 (140 mg/ml), dan kontrol positif menggunakan produk komersial *hand sanitizer*. Gambar hasil uji difusi sumuran *hand sanitizer* kitosan larut air terhadap *S. aureus* dan *E. coli* dapat dilihat pada Gambar 4. Dan 5.

Pada Gambar 4. dapat dilihat bahwa zona hambat terbesar terhadap *S. aureus* pada *hand sanitizer* konsentrasi 140 mg/ml sebesar 14,45 mm yang tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dengan konsentrasi 130 mg/ml yaitu sebesar 14,05 mm. Sedangkan Gambar 5. dapat dilihat hal yang seirama, bahwa zona hambat terbesar *E. coli* yaitu pada *hand sanitizer* konsentrasi 140 mg/ml sebesar 9,38 mm. Dengan demikian pengaruh *hand sanitizer* terhadap *S. aureus* menghasilkan zona hambat lebih besar daripada *E. coli*. Hal ini berarti *hand sanitizer* chitosan larut air lebih mudah terdifusi pada *S. aureus* (bakteri gram positif) daripada *E. coli* (bakteri gram negatif) karena bakteri ini memiliki struktur dinding sel dengan kandungan lipid rendah (1-4%) dan terdapat banyak pori-pori pada lapisan peptidoglikannya, yang membuat cairan *hand sanitizer* lebih mudah masuk ke dalam sel bakteri sehingga mengganggu metabolisme dan menyebabkan kematian sel (Li *et al.*, 2007). Sedangkan *E. coli* yang merupakan bakteri gram negatif memiliki struktur dinding sel lebih kompleks yaitu adanya lipoprotein, lipopolisakarida, dan fosfolipid serta kandungan lipid

dinding sel yang tinggi (11-12%). Adanya fosfolipid ini dapat mengurangi masuknya zat antibakteri kedalam sel (Fatisa, 2013).

Jika dibandingkan dengan aktivitas antibakteri chitosan larut air sebelum dibuat hand sanitizer, Zona hambat *hand sanitizer* terhadap kedua bakteri tersebut cenderung menurun. Hal ini menunjukkan bahwa kemampuan hambat chitosan larut air menurun saat diaplikasikan menjadi *hand sanitizer*. Penurunan ini terjadi karena adanya bahan tambahan lain yang ditambahkan kedalam *hand sanitizer* seperti trietanolamin, gliserin, polisorbit, metil paraben dan akuades. Adanya bahan-bahan pelengkap ini kemungkinan akan menghalangi masuknya chitosan larut air sebagai zat antibakteri kedalam sel bakteri sehingga daya hambat antibakterinya pun ikut menurun. Dengan demikian perlu peningkatan konsentrasi chitosan larut air ketika diaplikasikan kedalam produk *hand sanitizer*.

Begitu juga ketika dibandingkan dengan *hand sanitizer* komersial, daya hambatnya lebih rendah, produk ini menghasilkan zona hambat sebesar 15,9 mm terhadap *S. aureus* dan 12,5 mm terhadap *E. coli*. Tingginya zona hambat produk komersial ini kemungkinan disebabkan adanya alkohol sebagai komposisi utamanya. Dimana alkohol merupakan salah satu bahan antiseptik yang memiliki kemampuan hambat yang besar terhadap berbagai bakteri (Jones, 2000). Dari hasil regresi (data tidak ditunjukkan) *hand sanitizer* chitosan larut air perlu ditingkatkan konsentrasinya hingga 150,7 mg/ml agar memiliki daya hambat yang sama dengan *hand sanitizer* produk komersial terhadap *S. aureus* dan 197,7 mg/ml terhadap *Escherichia coli*.

Uji MIC dan MBC Hand sanitizer chitosan Larut Air Terhadap *S. aureus* dan *E. coli*

Penentuan nilai MIC dan MBC dilakukan dengan menggunakan metode difusi agar (sumuran) berdasarkan regresi linier (Bloomfield, 1991). Nilai MIC dan MBC *hand sanitizer* chitosan larut air terhadap pertumbuhan *S. aureus* dan *E. coli* metode Bloomfield (1991) dapat dilihat pada Tabel 5.

Pada Tabel 5. dapat dilihat bahwa nilai MIC dan MBC *hand sanitizer* terhadap *S. aureus* dan *E. coli* tidak jauh berbeda. Pada Tabel diatas terlihat bahwa nilai MIC dan MBC *hand sanitizer* chitosan larut air terhadap *S. aureus* lebih rendah (0,27 mg/ml dan 1,065 mg/ml) daripada nilai MIC dan MBC terhadap *E. coli* (0,26 mg/ml dan 1,048 mg/ml). Hal ini bukan berarti bakteri *E. coli* lebih rentan daripada *S. aureus*, karena dengan nilai MIC 0,27 mg/ml, artinya dengan konsentrasi 0,27 mg/ml *hand sanitizer* dapat menghambat pertumbuhan *S. aureus* sebesar 10,39 mm dalam waktu 6 jam inkubasi. Sedangkan *hand sanitizer* dengan MIC 0,262 mg/ml, artinya dengan konsentrasi 0,26 mg/ml dapat menghambat pertumbuhan *E. coli* sebesar 6,74 mm dalam waktu 6 jam inkubasi.

Hand sanitizer chitosan larut memiliki nilai MIC dan MBC tidak jauh berbeda dengan *hand sanitizer* minyak daun mint dengan nilai MIC sebesar 0,3 mg/ml terhadap *S. aureus* dan *E. coli*. Nilai MBC sebesar 0,31 mg/ml terhadap *S. aureus* dan *E. coli* (Chamsai et al.,2009). Jika dibandingkan secara keseluruhan, *hand sanitizer* chitosan larut air memiliki kemampuan menghambat bakteri (bakteriostatik) lebih baik dibandingkan *hand sanitizer* minyak daun mint. Namun *hand sanitizer* minyak daun mint memiliki kemampuan membunuh bakteri (bakterisidal) lebih baik dibandingkan *hand sanitizer* chitosan larut air.

Uji Iritasi In Vivo Hand sanitizer

Uji iritasi (eritema dan edema) *hand sanitizer* chitosan larut air secara *in vivo* pada kulit tikus wistar dan perhitungan indeks iritasi primer dapat dilihat pada Tabel 6.

Pada Tabel 6. pengamatan sampai 72 jam setelah diberikan *hand sanitizer* pada kulit punggung tikus memberikan skor eritema dan edema 0. Artinya *hand sanitizer* chitosan larut air pada semua formulasi yaitu F0, F1, F2, F3, dan F4 tidak melepaskan bahan-bahan kimia yang menyebabkan iritasi terhadap kulit punggung tikus yang berarti produk aman. Hal ini didukung Kuncari *et al.* (2015) bahwa semakin kecil nilai Indeks iritasi pada kulit, pada semakin baik pula sediaan produk yang diujikan. Nilai Indeks iritasi dibawah 0,4 dapat dikatakan sediaan suatu produk aman.

Kesimpulan

1. Chitosan larut air terbaik dihasilkan dari Konsentrasi H₂O₂ 13% dan suhu pemanasan 40 °C menghasilkan DD sebesar 94,21% ; kelarutan sebesar 94% ; kadar air sebesar 10,6% dan rendemen sebesar 3,5%
2. Konsentrasi chitosan larut air yang menghasilkan diameter zona hambat tertinggi pada bakteri *E. coli* dan *S. epidermidis* adalah 120 mg/mL sebesar 19,53 mm yang tergolong kuat dan 21,13 mm yang tergolong sangat kuat.
3. Nilai MIC chitosan larut air terhadap bakteri *E. coli* sebesar 0,28 mg/ml dan bakteri *S. epidermidis* sebesar 0,27 mg/ml.
4. Nilai MBC chitosan larut air terhadap bakteri *E. coli* sebesar 1,12 mg/ml dan bakteri *S. epidermidis* sebesar 1,08 mg/ml.
5. Formula *hand sanitizer* terbaik yaitu dengan penambahan chitosan larut air sebesar 130 mg/ml menghasilkan zona hambat sebesar 14,05 mm terhadap *S. aureus* dan sebesar 9,38 mm terhadap *E. coli*.
6. *S. aureus* lebih rentan terhadap *hand sanitizer* chitosan larut air yaitu dengan nilai MIC sebesar 0,27 mg/ml dan MBC sebesar 1,065 mg/ml sudah mampu menghambat ataupun membunuh bakteri dalam waktu 6 jam inkubasi.
7. Formula *hand sanitizer* chitosan larut air pada semua konsentrasi (110, 120, 130, dan 140 mg/ml) tidak menimbulkan iritasi ketika diaplikasikan pada kulit punggung tikus sampai dengan 72 jam

Saran

Pada penelitian ini telah diketahui bahwa semakin tinggi konsentrasi *hand sanitizer* kitosan larut air menghasilkan zona hambat yang semakin besar pula. Oleh karena itu, disarankan untuk dilakukan penelitian lebih mendalam mengenai uji aktivitas antibakteri hand sanitizer kitosan larut air dengan meningkatkan konsentrasinya dan diujikan terhadap bakteri yang berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

- Adrianna, M., Elvira, S & Setijawati V. 2001. Adsorpsi Cr (VI) dengan Adsorben Khitosan. *Jurnal Kimia Lingkungan*. **3**(1):107-117.
- Apriani, L., Iskandar, G. M., & Said, M. 2012. Pengaruh variasi konsentrasi NaOH terhadap nilai derajat deasetilasi pada pembuatan chitosan dari cangkang kulit kepiting. *Jurnal Teknik Kimia*. **1**(18) : 35-40
- Azwar., & Agoes. 2010. Tanaman Obat Indonesia. Salemba Medik. Jakarta
- Bahri, S., Rahim, E, A & Syarifuddin, S. Derajat deasetilaso kitosan dari cangkang kerang darah dengan penambahan NaOH secara bertahap. *Jurnal Riset Kimia*. **1**(1) : 34-39
- Basmal, J., A, Prasetyo., & Y. N, Fawzya, 2007. Pengaruh Konsentrasi Asam Monokloroasetat dalam Proses Karboksimetilasi Kitosan terhadap Karboksimetil Kitosan yang Dihasilkan. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*. **11**(8): 47-56.

- Bloomfield, S. F. 1991. Methods for Assessing Antimicrobial Activity. In: Denyer, S. P., Hugo, W. B. (ed). Mechanism of Action of Chemical Biocides Their Study and Xxploitation. Blackwell Scientific Publication. London. 4(2):102-106
- Chotiah, S. Potensi bakteriosin untuk kesehatan hewan dan keamanan bahan pangan. *Wartazoa*. **23** (2) : 94-101
- Dompeipen, E. J., Marni, K. & Riardi P. D. 2016. Isolasi kitin dan kitosan limbah kulit udang. *Jurnal Kementerian Perindustrian*. **12** (01) : 32-38
- Du, Y., Yuqiao, Z., Shuchao, D. & Bao, Y. 2002. Preparation of water soluble chitosan from shrimp shell and its antibacterial activity. *Innovative Food and Emerging Technologies*. **10** (1) :103-107
- Fatasa, Y. 2013. Daya Antibakteri Ekstrak Kulit dan Biji Buah Pulasan (*Nephelium mutabile*) Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* Secara In Vitro. *Jurnal Peternakan*. 10(1):44-50. Helander *et al.* (2001)
- Fatasa, Y. 2013. Daya Antibakteri Ekstrak Kulit dan Biji Buah Pulasan (*Nephelium mutabile*) Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* Secara In Vitro. *Jurnal Peternakan*. 10(1):44-50.
- Helander, I., Nurmiaho, L., E., Ahvenainen, R., Rhoades, J., & Roller. S. 2001. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gramnegative bacteria. *International Journal Food Microbiol* **71** (22) : 235- 244.
- Islam, M., Masum, S., Mahbud, K.R. & Haque, Z. 2011. Antibacterial Activity of Crab –Chitosan against *Staphylococcus aureus* and *Echerichia coli*. *Journal of Advanced Scientific Research*. 2(4):53-66. **4**(13).
- Jawetz, E., Melnick, J., L. & Adelberg, E, A. 2001. Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta. 21-88
- Jones, P. 2002. Alcohol Addiction : A Psychobiological Approach, Psychiatry, and Wellness Behavioral Medicine Accociate. New York Press. 135 pp.
- Knorr, D. 1982. Functional Properties Chitin and Chitosan. *Journal of Food Science*. **6** (47) : 593-595
- Kuncari, E.S., Iskandarsyah. & Praptiwi. 2015. Uji Iritasi dan Aktivitas Pertumbuhan Rambut Tikus Putih : Efek Sediaan Gel Apigenin dan Perasan Herba Seledri (*Apirum graveolens L.*). *Media Letbankes*. **25**(1). 15-22.
- Kurniasih, M., Dwi, K. & Riyanti. Optimasi kondisi adsorpsi kolestrol menggunakan karboksimetil kitosan. *Molekul*. **11** (1) : 112-124
- Kusumawati, N. 2000. Peranan Bakteri Asam Laktat. *Jurnal Teknologi Pangan dan Gizi*. 1 (1):15-22.
- Li, Y., Chen, X. G., Liu, N., Liu, C. S., Liu, C. G. & Meng, X. H. 2007. Physicochemical Characterization and Antibacterial Property of Chitosan Acetates. *Carbohydrate Polymers*. Vol.**67**:227–232.
- Liu, X, F., Yun, L, G., Dong, Z, Y., & Kang, D, Y. 2001. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Journl of Applied Polymer Science*. **79** (23) : 1324-1335
- Liu, Y., Hu, K. & Zhao, B. 2004. Study of Depolymerization Behavoir of Chitosan By Hydrogen Peroxide. *Carbohydrate Polymers*. **5**(7):31–37.
- Makuuchi, K. 2008. Comparative Analysis of Hydrogel and Oligo-Chitosan. EB System Comporation. Japan. 1–6pp.
- Marganov. 2003. Potensi Limbah Udang Sebagai Penyerap Logam Berat (Timbal, Kadmium, Tembaga) di Perairan. IPB Press. Bogor.
- Nadarajah, K. 2005. Development and characterization of antimicrobial edible film from crawfish chitosan. *Dessertation in Department of Food Science*. University of Paradeniya. Paradeniya. **15** (2) : 22-26

- Nandes, M. 2011. Kemampuan kitosan limbah cangkang udang sebagai resin pengikat logam tembaga (Cu). SKRIPSI. Jurusan Teknik Linguangan. Fakultas Teknik Universitas Andalas. Padang. 1-99
- Oh H., Kim Y., & Chang E, Kim J. 2001. Antimicrobial characteristics of chitosans against food spoilage microorganisms in liquid media and mayonnaise. *Biosci Biotechnol Biochem.* **65** (11) : 2378- 2383
- Park P.J., Je JY., Byun HG., Moon, SH. & Kim, SK. 2004. Antimicrobial activity of hetero-chitosans and their oligosaccharides with different molecular weights. *Journal Microbiol Biotechnol.* **14** (2) : 317-323
- Purbowati, P. Upaya peningkatan derajat deasetilasi pada kitosa cangkang kerang kampak (*Atrina pectinata*) melalui proses deasetilasi kitin secara bertahap. SKRIPSI. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Unversitas Airlangga. Surabaya : 1-49
- Purwantoro, R. S., Hartutiningsih, M. S., Sudarmono., & Praptiwi. 2010. Uji antibakteri *lasianthus (rubiaceae)* sebagai tumbuhan berkhasiat obat dan upaya perbanyakannya. *Buletin Kebun Raya.* **13** (2) : 123-12
- Rochima, E. 2007. Karakteristik kitin dan kitosan asal limbah rajungan Cirebon, Jawa Barat. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia.* **10** (1) : 23-28
- Safitri, A, S. 2016. Aktivitas antibakteri kitosan berbasis cangkang lobster terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis*. SKRIPSI. Departemen Teknologi Hasil Perairan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 1-4
- Saleh, M, R., Abdillah., Suerman, E., Basmal, J. & Indriati, N. 1994. Pengaruh suhu, waktu dan konsentrasi pelarut pada ekstraksi kitosan dari limbah pengolahan udang beku terhadap beberapa parameter mutu kitosan. *Jurnal Pasca Panen Perikanan* **81** (15) : 30-43
- Savant., D. Vivek. & J.A, Torres. 2000. Chitosan Based Coagulating Agents For Treatment of Cheddar Chees Whey. *Biotechnology Progress.* **16**(1):24-28
- Setiawan, D. 2006. Atlas Tumbuhan Obat Indonesia, jilid 4. Puspa swara. Jakarta. 1-79
- Sugita. 2009. Kitosan : Sumber Biomaterial Masa Depan. IPB Press. Bogor. 15- 21
- Tanasale, M., Telussa, I., Sakewael, S.J. & Kakerissa, L. 2016. Extraction and Characterizaion of Chitosan From Windu Shrimp Shell (*Panaeus monodon*) and Depolymerization Chitosan Process With Hydrogen Peroxide Based on Heating Temperature Variations. *Indonesian Journal Chemistry.* **3**(2):306-318. Tian, F.,
- Tanasale, M., Telussa, I., Sakewael, S.J. & Kakerissa, L. 2016. extraction and characterizaion of chitosan from windu shrimp shell (*Panaeus monodon*) and depolymerization chitosan process with hydrogen peroxide based on heating temperature variations. *Indian Journal Of Chemistry Research.* **3**(2) : 168-173
- Tiyaboonchai, R. 2003. Chitosan nanoparticles: A promising system for drug delivery. *Naresuan University Journal.* **3** (11) : 51–66 Trimulyadi (2013
- Tsai, G, J., Wu, Z, Y. & Su, W, H. 2000. Antibacterial activity of chitoolligosaccharide mixture prepered by colluse digestion of shrimp chitosan and its application to milk preservation. *Journal Food Protection.* **13** (63) : 747-752
- Wei, C. C., Hii, S. L. & W, C. L. 2011. Antibacterial Activity of *Sargassum polycystum* C. Agardh and *Padina australis* Hauck (*Phaeophyceae*). *African Journal of Biotechnology/.* **10**(64):101-110.
- Yudihapsari, E. 2009. Kajian kadar protein, ph, viskositas dan rendemen kecap dari berbagai tingkat penggunaan tepung kedelai. SKRIPSI. Program Studi Teknologi Hasil Ternak. Fakultas peternakan. Universitas Brawijaya. Malang. 1-95
- Zahiruddin, W., Ariesta, A. & Salamah, E. 2008. Karakterisasi Mutu dan Kelarutan Kitosan Dari Ampas Silase Kepala Udang Windu (*Panaeus monodon*). *Jurnal Buletin Teknologi Hasil Perikanan.* **11**(2):56-59.