

Antibacterial Activity Of Freshwater Lobster Shells (*Cherax quadricarinatus*) Against *Escherichia coli*

Putri Hafizha
Ridwanto Ridwanto*
Anny Sartika Daulay
Haris Munandar Nasution

Faculty of Pharmacy, Universitas
Muslim Nusantara Al-Washliyah,
Garu II A, Harjosari 1, Sumatera
Utara, 20147, Indonesia
*email: ridwanto@umnaw.ac.id

Keywords:

Chitosan
Escherichia coli
Freshwater lobster
FTIR spectrophotometry

Received: January 2024

Accepted: Februari 2024

Published: April 2024

Abstract

People still do not utilize freshwater lobster (*Cherax quadricarinatus*) shells optimally, even though the chitin compound contained in this waste can be modified into chitosan through chemical reactions. Chitosan obtained from freshwater lobster shells can be used as an antibacterial. This study aims to test the antibacterial activity of chitosan from freshwater lobster shell waste against *Escherichia coli* bacteria. Making chitosan is carried out through three processes, namely, demineralization, deproteination, and deacetylation stages. Then, characterization of the chitosan is carried out, which includes water content, ash content, yield, and solubility. The research results showed that the chitosan obtained in this study was 43.96%, and the degree of deacetylation value of freshwater lobster shell chitosan was 75.11%. Chitosan with a concentration of 0.3, 0.5, 0.7, and 0.9% provides an inhibition zone of 13.5, 15.9, 16.8, and 17.2 mm, respectively, against *Escherichia coli*. Thus, a concentration of 0.9% chitosan from freshwater lobster shells has better antibacterial activity and is categorized as having strong inhibitory power.

PENDAHULUAN

Lobster merupakan salah satu komoditas perikanan Indonesia yang melimpah. Pada umumnya, lobster dimanfaatkan tanpa kepala dan kulit. Hal itu menyebabkan limbah yang cukup bervariasi, yang berkisar antara 65- 85% dari berat lobster tergantung dari jenisnya (1). Limbah lobster padat biasanya hanya dimanfaatkan sebagai campuran pakan ternak dan tanpa disadari bahwa limbah lobster tersebut mengandung kitin sebagai bahan pembuat kitosan yang dapat dimanfaatkan sebagai antibakteri (2).

Kitosan merupakan polimer dari karbohidrat yang sangat berpotensi untuk dikembangkan terutama di Indonesia. Saat ini kegunaan kitosan sangat banyak di berbagai bidang diantaranya bidang farmasi, kedokteran, industry, pangan, pertanian termasuk juga kosmetik (3). Kitosan memiliki sifat unik seperti larut

dalam larutan asam, tidak beracun, biodegradable dan biokompatibel (4). Berdasarkan sifat-sifat ini, kitosan banyak digunakan dalam industri, obat-obatan dan tekstil (5). 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* (6).

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 (7).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kitosan memiliki sifat antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen termasuk bakteri Gram-positif dan Gram-negatif. Menurut hasil penelitian dari Nadia et al, hasil uji aktivitas antibakteri yang efektif menunjukkan pada media yang berisi biakan *E. coli* dengan kitosan 0,8% memiliki zona hambat yang paling besar yakni 12,8 mm (8).

Kitosan memiliki banyak manfaat, maka peneliti bertujuan untuk mengisolasi kitosan dari cangkang lobster air tawar (*Cherax quadricarinatus*) yang kemudian akan diuji aktivitas antibakterinya terhadap *Escherichia coli*. Berdasarkan uraian diatas maka peneliti tertarik untuk melakukan penelitian tentang Aktivitas Antibakteri Kitosan Cangkang Lobster Air Tawar (*Cherax Quadricarinatus*) Terhadap *Escherichia Coli*.

METODE

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah oven, blender, timbangan analitik, tanur, alat-alat gelas pyrex, Laminar Air Flow dan alat-alat uji antibakteri. Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah cangkang lobster air tawar (*Cherax quadricarinatus*) NaCl, HCL pekat, NaOH, AgNO₃, Indikator PP, asam asetat glasial, aquades, NaCl 0,9%, dan Mullen Hilton Agar.

Sampel

Sampel diambil dari Perairan Danau Toba. Metode pengambilan sampel dilakukan dengan cara Purposive, yaitu sampel diambil pada satu daerah saja dan tidak ada perbandingan dari daerah lain. Kemudian limbah dicuci dengan air bersih, cangkang dikeringkan

dibawah sinar matahari sampai benar-benar kering. Setelah kering dihaluskan dengan menggunakan mesin penggiling bumbu, lalu diayak (9).

Pembuatan Kitosan

Proses Demineralisasi

Cangkang lobster yang telah dihaluskandimasukkan dalam beaker glass dan ditambahkan larutan HCl 1,5 N dengan perbandingan 1:15 (w/v). Proses penghilangan mineral dipanaskan selama 4 jam pada suhu 50°C sambil dilakukan pengadukan dengan kecepatan 50 rpm menggunakan magnetic stirrer. Kemudian, dilakukan sentrifugasi selama 15 menit dalam kecepatan 2000 rpm dan diperoleh dalam bentuk supersenatan. Padatan dicuci dengan aquades hingga pH air pencucinetral. Filtrat akhir yang diperoleh diuji dengan AgNO₃, jika sudah tidak terbentuk endapan putih maka sisaion Cl⁻ yang terkandung sudah hilang. Kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 80°C selama 24 jam (1).

Proses Deproteinasi

Serbuk cangkang lobster hasil dari dimenarilisasi dimasukkan dalam beaker glass dan ditambahkan larutan natrium hidroksida 3,5% dengan perbandingan 1:10 (w/v). Proses penghilangan protein dipanaskan selama 4 jam pada suhu 50°C sambil dilakukan pengadukan dengan kecepatan 50 rpm menggunakan magnetic stirrer. Kemudian, dilakukan sentrifugasi selama 15 menit dalam kecepatan 2000 rpm dan diperoleh dalam bentuk supersenatan. Padatan dicuci dengan aquades hingga pH air pencucinetral. Filtrat akhi yang diperoleh diuji dengan indikator PP, jika tidak terjadi perubahan warna merah bata sisa maka ion OH⁻ yang terkandung sudah hilang. Kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 80°C selama 24 jam (10).

Proses Deasetilasi

Serbuk cangkang lobster hasil dari dimenarilisasi dan deproteinisasi dimasukkan dalam

baeker glass dan ditambahkan larutan natrium hidroksida 60% dengan perbandingan 1:20 (w/v). Campuran larutan dipanaskan selama 4 jam pada suhu 50°C sambil dilakukan pengadukan dengan kecepatan 50 rpm menggunakan magnetic stirrer. Kemudian, dilakukan sentrifugasi selama 15 menit dalam kecepatan 2000 rpm dan diperoleh dalam bentuk supersenatan. Padatan dicuci dengan aquades hingga pH air pencucinetral, kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 80°C selama 24 jam sehingga diperoleh kitosan (11).

Karakterisasi Kitosan

Kitosan yang dihasilkan di karakterisasi dengan menggunakan spektrofotometri FTIR untuk memnutukan derajat deasetilasi. Dan dilakukan karakteristik lainnya yaitu organoleptis, rendemen kitin menjadi kitosan, kadar air, kadar abu, dan kelarutan.

Pemeriksaan Organoleptis

Pemeriksaan organoleptis dilakukan terhadap kitosan cangkang lobster air tawar (*Cherax quadricarinatus*) yaitu dengan mengamati bentuk, bau, warna, dan rasa (12).

Rendemen

Rendemen transformasi kitin menjadikitosan ditentukan berdasarkan persentase beratkitosan yang dihasilkan terhadap berat kitin yang diperoleh (13).

Penetapan Kadar Abu

Sebanyak 2 g serbuk simplisia ditimbang seksama, dimasukkan ke dalam kurs porselin yang telah dipijar dan ditara, lalu diratakan. Kurs dipijar pada suhu 600°C sampai arang habis, didinginkan dan ditimbang sampai diperoleh bobot tetap, kadar abu dihitung dalam persen terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (14).

Penetapan Kadar Air

Kadar air merupakan parameter yang sangat penting untuk menentukan kualitas

kitosan. Biopolimer protana menetapkan baku mutu kadar air kitosan adalah kurang dari 10%. Kadar air dapat diuji menggunakan metode AOAC dengan pemanasan. Ditimbang sampel sebanyak 0,5 g dalam cawan porselin yang telah doketahui beratnya. Dimasukkan dalam oven pada suhu 100-105°C selama 1-2 jam tergantung bahannya. Kemudian dinginkan dalam desikator selama 30 menit dan ditimbang. Dipanaskan lagi dalam oven, didinginkan dalam desikator dan di ulani hingga berat konstan (15).

Uji Kelarutan Kitosan

Menurut Agutina et al (2013) kelarutan kitosan merupakan salah satu parameter yang dapat dijadikan sebagai standar ukur kualitas kitosan. Semakin tinggi kelarutan kitosan maka semakin baik kualitas kitosan yang dihasilkan. Dalam hal ini kitosan dilarutkan dalam asam asetat glasial 1% dengan pebandingan 1:100 (g/ml) (16).

Pengujian Aktivitas Antibakteri

Aktivitas antibakteri dari kitosan ditentukan dengan menggunakan metode sumuran difusi agar. Pengujian ini dimulai dengan penyiapan media untuk pertumbuhan bakteri yaitu Mueller Hinton Agar. Media sebanyak 20 mL dimasukkan ke dalam cawan petri dan ditambahkan suspensi bakteri sebanyak 0,2 mL. Cawan digerakan secara memutar agar homogen. Kemudian, media dibiarkan memadat dan dibuat 4 lubang dengan jarak yang sama antar lubang. Kemudian larutan kitosan sebanyak 60µL dengan konsentrasi 0,3; 0,5; 0,7 dan 0,9% (b/v). Kitosan yang digunakan adalah kitosan 1% yang dilarutkan dalam asam asetat 2% (pH 4,4). Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Amoxicilin digunakan

sebagai kontrol positif sedangkan kontrol negatif hanya larutan asam asetat saja (2).

Pewarnaan Bakteri Escherichia coli

Pewarnaan dilakukan dengan cara menyiapkan media yang telah berisi sampel. Langkah-langkah pewarnaan sebagai berikut: Bersihkan gelas benda dengan alkohol hingga bebas lemak kemudian buatlah olesan bakteri pada gelas benda tersebut. Kering anginkan dan kemudian fiksasi dengan pemanasan dan bubuhi secara merata olesan tersebut dengan kristal violet (Gram A) dan biarkan selama 30 detik, kemudian cuci sampai bersih dengan air mengalir. Bubuhi merata dengan larutan iodine (Gram B, larutan mordant), biarkan selama satu menit, kemudian cuci dengan air mengalir. Tuangi dengan etil alkohol 96% (Gram C) selama 15 - 25 detik untuk dekolorisasi (penghilangan cat). Dekolorisasi telah terjadi dan berakhir ketika aliran solvent (etil alkohol) menjadi tidak berwarna lagi. Selanjutnya cuci bersih dengan air mengalir. Selanjutnya bubuhi dengan safranin (Gram D) selama 45 detik, dicuci dengan air mengalir dan kering anginkan. Kemudian pengamatan dengan mikroskop cahaya (17).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tahap isolasi kitin dimulai dari proses demineralisasi. Proses demineralisasi bertujuan untuk menghilangkan garam-garam anorganik atau kandungan mineral yang ada pada kitin seperti: kalsium, magnesium, fosfor, besi, mangan, kalium, tembaga, natrium, seng dan sulfur. Proses yang terjadi pada tahap demineralisasi adalah mineral yang terkandung dalam sampel akan bereaksi dengan HCl sehingga terjadi pemisahan mineral dari cangkang lobster tersebut. Terjadinya proses pemisahan mineral

ditunjukkan dengan terbentuknya gas CO₂ berupa gelembung udara pada saat larutan HCl ditambahkan dalam sampel, sehingga penambahan HCl harus dilakukan secara perlahan agar tidak meluap. Demineralisasi adalah proses penghilangan kandungan mineral yang ada pada cangkang lobster air tawar yaitu salah satunya kalsium. Tidak terbentuknya endapan putih ketika di reaksikan dengan AgNO₃ menunjukkan sudah tidak mengandung mineral. Kemudian setelah sampel bebas dari mineral dilanjutkan tahap selanjutnya yaitu tahap deproteinisasi.

Tahap deproteinasi menggunakan NaOH 3,5% dengan cara merendam sampel selama 4 jam dan dilakukan pemanasan pada suhu 50°C setelah itu dikeringkan dalam oven selama 24 jam pada suhu 80°C. Tahap ini bertujuan untuk memisahkan atau melepaskan ikatan-ikatan protein dari kitin. Pada tahap deproteinasi ini, protein yang terkandung dalam cangkang lobster akan larut dalam basa sehingga protein yang terikat secara kovalen pada gugus fungsi kitin akan terpisah. Proses penghilangan protein dari cangkang lobster air tawar atau deproteinasi di tandai dengan tidak terbentuk warna ungu ketika direaksikan dengan pereaksi indikator PP. Protein yang terdapat pada cangkang lobster air tawar bereaksi dengan NaOH menghasilkan Na-proteinat yang larut. Proses selanjutnya adalah deasetilasi kitin untuk mendapatkan kitosan.

Tahap deasetilasi dilakukan dengan merendam kitin menggunakan NaOH p.a 60% dengan perbandingan 1:20 (b/v) selama 4 jam pada suhu 40-50°C kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 80°C selama 24 jam. Kondisi ini digunakan karena struktur sel-sel kitin yang tebal dan kuatnya ikatan hidrogen intramolekuler antara atom hidrogen pada gugus amin dan atom oksigen pada gugus karbonil. Proses deasetilasi dalam basa kuat panas menyebabkan

hilangnya gugus asetil pada kitin melalui pemutusan ikatan antara karbon pada gugus asetil dengan nitrogen pada gugus amin. Reaksi pembentukan kitosan dari kitin merupakan reaksi hidrolisa suatu amida oleh suatu basa. Kitin bertindak sebagai amida dan NaOH sebagai basanya. Mula-mula terjadi reaksi adisi, dimana gugus -OH masuk ke dalam gugus NHCOCH_3 kemudian terjadi eliminasi gugus CH_3COO sehingga dihasilkan suatu amina yaitu kitosan (16).

Karakterisasi Kitosan Dari Cangkang Lobster Air Tawar

Hasil Karakterisasi kitosan meliputi kadar air yang diperoleh sebesar 0,059%, kadar abu dari kitosan sebesar 0,79 %, hasil uji kelarutan kitosan menggunakan

asam asetat glasial 2 % teridentifikasi larut, bentuk dari kitosan yang diperoleh adalah berbentuk serbuk, warna dari kitosan yang diperoleh berwarna coklat muda dan aroma yang di hasilkan tidak berbau. Dari hasil penelitian yang ditunjukkan pada tabel di atas terlihat bahwa kitosan yang diperoleh memenuhi nilai Standar Nasional Indonesia (SNI) dan dapat digunakan untuk berbagai aplikasi.

Aktivitas Antibakteri

Aktivitas antibakteri dari kitosan terhadap E.coli dilakukan dengan metode sumuran. Dengan diameter zona hambat dari itosan yang dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Terhadap Bakteri Escherichia coli

Konsentrasi	Zona hambat (mm)			Rata-rata (mm)
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3	
0,3%	13,8	12,9	13,8	13,5
0,5%	15,9	15,8	16,1	15,9
0,7%	16,9	16,6	16,9	16,8
0,9%	17,9	16,9	16,8	17,2
Kontrol Negatif		0		
Kontrol positif		17,7		

yaitu

Berdasarkan hasil pengujian aktivitas antibakteri dari kitosan yang dilakukan, semakin tinggi konsentrasi kitosan, maka aktivitas antibakterinya juga smakin meningkat. Kitosan dengan konsentrasi 0,3% memberikan zona hambat sebesar 13,5 mm dan konsentrasi 0,9% memberikan zona hambat sebesar 17,2 mm. Aktivitas antibakteri pada konsentrasi kitosan kitosan 0,9% lebih baik bila dibandingkan dengan konsentrasi 0,3%.

Zona hambat yang terbentuk pada media dapat dikategorikan ke dalam empat kategori,

yaitu daya hambat lemah zona hambat yang terbentuk kurang dari 5 mm, daya hambat sedang yaitu zona hambat yang terbentuk 5-10 mm, daya hambat kuat yaitu zona hambat yang terbentuk 10-19 mm sedangkan daya hambat sangat kuat zona hambat yang terbentuk lebih dari 20 mm. Maka, hasil uji aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa zona hambat yang terbentuk dari kitosan cangkang lobster air tawar dikategorikan dalam daya hambat kuat.

Pada pewarnaan Gram, bakteri gram negatif akan kehilangan zat pewarna kristal violet setelah dicuci dengan alkohol, dan sewaktu diberi zat pewarna tandingannya yaitu dengan zat

pewarna safranin akan tampak berwarna merah. Perubahan warna ini disebabkan karena struktur kimiawi pada dinding sel bakteri tersebut. Dinding sel bakteri gram negatif mengandung satu atau beberapa lapis peptidoglikan dan membran luar (outer membrane). Peptidoglikan terikat pada lipoprotein pada membran luar. Terdapat daerah periplasma yaitu daerah yang terdapat diantara membran plasma dan membran luar. Periplasma berisi enzim degradasi konsentrasi tinggi serta proteinprotein transpor. Dinding sel bakteri Gram negatif tidak mengandung asam teikoat dan karena hanya mengandung sejumlah kecil peptidoglikan, maka dinding sel bakteri Gram negatif lebih rentan terhadap kerusakan mekanis. Inilah yang menyebabkan ketika diberi alkohol pada pengecatan Gram, dinding sel bakteri Gram negatif kehilangan warna, sehingga ketika diberi pewarna safranin akan tampak seperti warna cat terakhir tersebut (17). Dari hasil pewarnaan Gram, semua sampel berwarna merah muda. Artinya semua sampel mengandung bakteri gram negatif. Bakteri *E. coli* merupakan salah satu bakteri gram negatif.

KESIMPULAN

Kitosan hasil isolasi dari cangkang lobster air tawar memiliki nilai rendemen 43,96%. Aktivitas antibakteri kitosan pada *E. coli* dengan zona hambat 17,2 mm pada konsentrasi 0,9% lebih baik dalam menghambat bakteri *E. coli* dibandingkan dengan zona hambat 13,5 mm pada konsentrasi 0,3%.

DAFTAR PUSTAKA

1. Agustina S, Swantara IMD, Suartha IN. Isolasi kitin, karakterisasi, dan sintesis kitosan dari kulit udang. *Jurnal Kimia*. 2015;9(2):271-8.
2. Magani AK, Tallei TE, Kolondam BJ. Uji Antibakteri Nanopartikel Kitosan terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Bios Logos*. 2020;10(1):7-12.
3. Rani Z, Nasution HM, Kaban VE, Nasri N, Karo NB. Antibacterial activity of freshwater lobster (*Cherax quadricarinatus*) shell chitosan gel preparation against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2023;13(2):146-53.
4. Nurhayati N, Ridwanto R, Daulay AS, Syahputra RA, Rani Z. Utilization Of Chitosan As A Natural Preservative Against Catfish. *International Journal of Science, Technology & Management*. 2022;3(5):1396-401.
5. Sepvina NI, Ridwanto R, Rani Z. Uji Toksisitas Kitosan Cangkang Kerang Bulu (*Anadara antiquata*) Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina*. 2022;7(2):380-9.
6. Danarto YC, Distantina S. Optimizing deacetylation process for chitosan production from green mussel (*perna viridis*) shell. In: *AIP Conference Proceedings*. AIP Publishing; 2016.
7. Killay A. Chitosan as an Antibacterial in Safe and Harmless Food Materials. *Proceedings of the Faculty of Mathematics and Natural Sciences*. University of Pattimura; 2013.
8. Nadia LMH, Effendy WNA, Rieuwpassa FJ, Imra I, Nurhikma N, Cahyono E. Aktivitas antibakteri kitosan dari tulang rawan cumi-cumi (*loligo sp.*) Terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Fishtech*. 2021;10(2):95-101.
9. Nasution FAU, Ridwanto R, Rani Z. Uji sitotoksisitas ekstrak etanol daun sirih cina (*Peperomia pellucida* [L.] Kunth) dengan metode brine Shrimp lethality test. *Journal of Pharmaceutical and Sciences*. 2023;1927-34.
10. Ridwanto R, Pratiwi A, Rani Z. Isolation and Toxicity Test of Chitosan from Green Mussels (*Perna viridis* L.) With Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) Method. *Jurnal Sains dan Kesehatan*. 2023;5(5):759-65.

11. Ridwanto R, Rosa VD, Rani Z, Fauzi ZPA. Utilization of Chitosan from Fresh Water Lobster (*Cherax quadricarinatus*) Shells in Anti-Acne Gel Preparations. *Trends in Sciences*. 2024;21(2):7243-7243.
12. Rizki D, Rani Z. Isolasi Dan Identifikasi Kitosan Dari Cangkang Kerang Bulu (*Anadara antiquata*). *Media Farmasi*. 2023;19(2):74-80.
13. Aditia RP, Pratama G, Munandar A, Surilayani D, Haryati S, Rizky JA, et al. KARAKTERISASI KITOSAN KOMBINASI CANGKANG KERANG HIJAU (*Perna viridis*) DAN CANGKANG RAJUNGAN (*Portunus pelagicus*) ASAL BANTEN, INDONESIA. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. 2023;12(2):173-85.
14. Ridwanto R, Saragih DS, Rani Z, Pulungan AF, Syahputra RA, Kaban VE, et al. TOXICITY TEST OF VANAME SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*) SKIN CHITOSAN USING BRINE SHRIMP LETHALITY TEST (BSLT) METHOD. *Rasayan Journal of Chemistry*. 2023;16(4).
15. Arsyi NZ, Nurjannah E, Nurahlina D, Budiayati E. Karakterisasi nano kitosan dari cangkang kerang hijau dengan metode gelasi ionik. *Jurnal Teknologi Bahan Alam*. 2018;2(2):106-11.
16. Agustina S, Kurniasih Y. Pembuatan kitosan dari cangkang udang dan aplikasinya sebagai adsorben untuk menurunkan kadar logam Cu. In: *Prosiding Seminar Nasional MIPA*. 2013.
17. Tivani I, Amananti W, Sunardi A. Uji Identifikasi Bakteri *Esherichia coli* pada Jamu Gendong Kunyit Asem di Kabupaten Tegal. *Para pemikir: Jurnal Ilmiah Farmasi*. 2019;8(1):31-5.