

## KITOSAN OLIGOSAKARIDA: PRODUKSI DAN POTENSINYA SEBAGAI ANTIBAKTERI

Ariyanti Suhita Dewi dan Yusro Nuri Fawzya

*Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi  
Kelautan dan Perikanan*

### PENDAHULUAN

Kitosan adalah polimer alam yang merupakan heteropolisakarida linier derivat dari kitin, tersusun dari ikatan  $\beta$ -1,4-D-glukosamin (GlcN) dan N-asetil-D-glukosamin (GlcNAc) dengan proporsi yang bervariasi (Cabrera & Cutsem, 2005). Salah satu sumber potensial kitin adalah cangkang krustasea yang diketahui mengandung 30-40% protein, 30-50% kalsium karbonat dan 20-30% kitin. Proporsi tersebut bervariasi tergantung pada jenis krustasea dan musimnya (Cho *et al.*, 1998).

Industri perikanan seperti pengolahan udang, kepiting, rajungan dan lobster dapat menghasilkan limbah berupa cangkang yang jumlahnya berkisar antara 40-60% untuk udang dan 75-85% untuk kepiting (Suryaningrum *et al.*, 2005). Produksi rajungan dan udang di Indonesia tahun 2002 masing-masing adalah 31.228 ton dan 241.485 ton (Ditjen Perikanan Tangkap, 2004 dalam Oktavia *et al.*, 2005), sehingga limbah (cangkang) yang dihasilkan masing-masing diperkirakan mencapai 25.000 ton dan 126.000 ton.

Selain dari limbah krustasea, kitin juga dapat diperoleh dari dinding sel jamur/fungi tertentu dan kutikel serangga. Pada fungi, kitin terdapat dalam bentuk berikatan dengan polisakarida yang lain seperti glukukan. Sintesis kitin dari fungi terjadi karena adanya enzim kitin sintase dalam mikroorganisme tersebut. Tidak hanya kitin, kitosan secara alami juga dapat ditemukan pada dinding sel

fungi tertentu yaitu *Rhizopus*, *Absidia* dan *Fusarium* (Shimosaka *et al.*, 1996). Namun demikian, kitosan secara komersial diperoleh dari bahan baku limbah krustasea melalui proses deproteinasi, demineralisasi dan deasetilasi.

Sejak ditemukan oleh Rouget tahun 1859, kitosan terus diteliti dan penelitiannya berkembang hingga saat ini. Hal ini didasarkan pada fakta bahwa kitosan merupakan suatu polisakarida dengan berbagai kelebihan dibandingkan polimer pada umumnya seperti sifatnya yang natural, tidak beracun dan *biodegradable*. Sifat kimiawi dan biologisnya yang unik menjadikan kitosan banyak diaplikasikan untuk keperluan komersial (Cho *et al.*, 1998; Oktavia *et al.*, 2005).

Meskipun kitosan tersedia secara melimpah di alam, aplikasinya dalam bidang pangan dan farmasi masih terbatas karena kelarutannya dalam air rendah, berat molekulnya tinggi dan viskositasnya juga tinggi (Il'ina *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2005). Oleh karena itu, dewasa ini penelitian tentang kitosan lebih banyak diarahkan pada produksi kitosan yang larut dalam air, salah satu diantaranya adalah kitosan oligosakarida (COs).

### Kitosan Oligosakarida (COs)

#### Metode produksi COs

COs merupakan produk hidrolisis kitosan yang terdiri dari 2-10 D-glukosamin (Kuo *et al.*, 2004). COs dapat dibuat secara hidrolisis kimiawi dan enzimatis.

Secara kimiawi, kitosan oligosakarida umumnya diproduksi dengan menggunakan asam nitrat (Allan & Peyron, 1995) atau asam klorida pekat (Cabrera & Cutsem, 2005). Cara ini dinilai memiliki beberapa kelemahan antara lain proses produksi yang lama, sulit dikontrol, beracun, dapat mengubah struktur produk, terlalu banyak menghasilkan monomer serta menghasilkan oligosakarida dengan derajat polimerisasi (DP) yang rendah (berkisar antara DP 2 hingga 5) yang diakibatkan oleh rendahnya efisiensi dan pemotongan yang acak (Cheng & Li, 2000).

Produksi COs yang lebih efektif dan seragam dapat dilakukan melalui hidrolisis kitosan secara enzimatis. Dengan cara ini, proses produksi lebih mudah dikontrol (Choi *et al.*, 2004). Enzim yang berperan dalam proses hidrolisis ini adalah enzim kitosanase atau kitinase yang dapat diisolasi dari mikroorganisme, yang secara rinci dapat dilihat pada Tabel 1. Umumnya kitosanase menghidrolisis kitosan secara *endo-type cleavage* dan memiliki aktivitas yang tinggi terhadap kitosan dengan derajat deasetilasi lebih dari 70% untuk menghasilkan oligosakarida dengan DP 2-6. Meskipun memiliki berbagai kelebihan, enzim kitosanase dan kitinase masih terbentur keterbatasan jumlah dan harga untuk aplikasinya secara komersial.

Menjawab tantangan tersebut, alternatif kitosanolisis juga dapat dilakukan secara non-spesifik menggunakan enzim-enzim hidrolase komersial, seperti papain,

Tabel 1. Kitosanase yang telah diisolasi dari beberapa mikroorganisme

Mikroorganisme	Mekanisme aksi	Produk
<i>Bacillus</i> sp. strain KCTC 0377BP	Endo	G3-G7
<i>B. cereus</i> S1	Endo	G2-G4
<i>B. megaterium</i> P1 kitosanase A	Endo	Oligomer
<i>Bacillus</i> sp strain KFB-C108	Endo	G3-G5
<i>Aspergillus oryzae</i> IAM2660	Endo	Oligomer
	Exo	G1
<i>Nocardia orientalis</i> IFO 12806	Exo	G1
<i>Acinetobacter</i> sp. strain GHB101	Endo	G2
	Exo	G3
<i>Enterobacter</i> sp. strain G1	Exo	G2
<i>Myxobacter</i> strain AL-1	Endo	Tidak ditentukan
<i>Matsuebacter chitosanobidus</i> 3001	Endo	G1-G3

Sumber: Choi et al. (2004)

lisozim, lipase, selulase, hemiselulase,  $\beta$ -glukosidase, pektinase dan sebagainya. Kumar et al. (2004, 2005) melaporkan bahwa kitosan yang dihidrolisis menggunakan enzim pronase dan papain dapat menghasilkan produk depolimerisasi berupa kitosan berat molekul rendah (massa molekul berkisar antara 8,5-9,5 kDa, tergantung waktu inkubasi) dengan

rendemen 74-80% serta COs dan monomer dengan rendemen 10-12%.

Cabrera & Cutsem (2005) melakukan depolimerisasi kitosan menggunakan enzim pektinase (Pectinex Ultra Spl.) dan melaporkan bahwa jenis oligosakarida yang dihasilkan setelah proses hidrolisis selama 24 jam mempunyai DP 6-11 dengan

rendemen sebesar 17%. Metode pembuatan kitosan-oligosakarida secara umum disajikan pada Gambar 1.

#### Aktivitas antibakteri COs

Telah banyak dilaporkan bahwa COs terbukti mempunyai aktivitas biologis antara lain sebagai antimikroba, stimulan kekebalan tubuh dan antitumor (Kumar et al.,



Gambar 1. Metode umum pembuatan kitosan oligosakarida.

2004). Panjang rantai dan derajat deasetilasi kitosan diduga sebagai faktor penting yang mempengaruhi aktivitas biologis tersebut. COs dengan panjang rantai lebih dari heksamer mempunyai aktivitas biologis yang lebih baik dibandingkan oligosakarida yang lebih pendek. Sedangkan peningkatan derajat deasetilasi kitosan oligosakarida berpengaruh pada aktivitas antimikroba dan anti-kolesterol. Oleh sebab itu, kontrol terhadap panjang rantai dan derajat deasetilasi sangat penting dalam proses produksi kitosan oligosakarida (Choi *et al.*, 2004).

Kumar *et al.* (2005) dan Kittur *et al.* (2005) menguji aktivitas antibakteri COs yang diproduksi dengan menggunakan enzim pektinase isoform dari *Aspergillus niger* antara lain terhadap *Bacillus cereus* (bakteri gram positif) dan *Escherichia coli* (bakteri gram negatif). Hasil penelitian menunjukkan bahwa COs memiliki efek penghambatan pertumbuhan yang lebih baik terhadap kedua

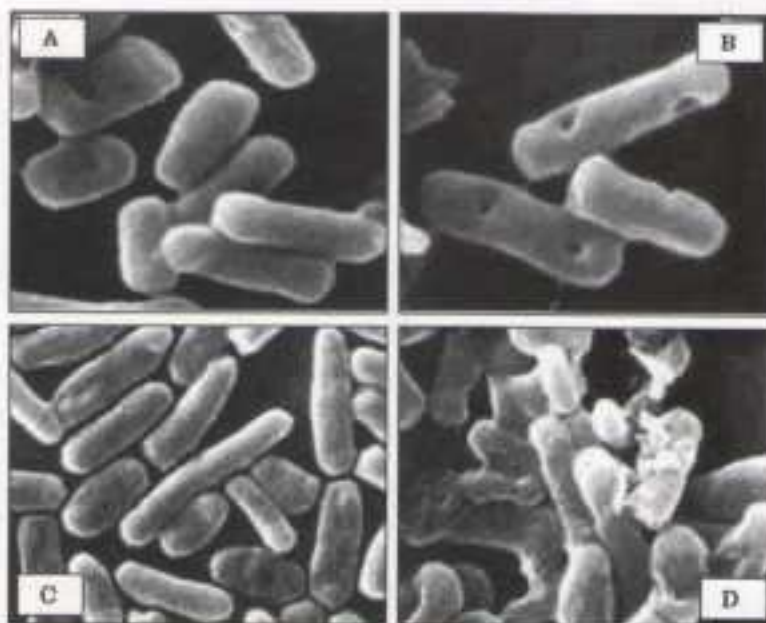
bakteri tersebut dibandingkan kitosan. Kendati demikian, peningkatan konsentrasi COs tidak menunjukkan hubungan linier dengan peningkatan aktivitas antibakteri. Sementara pengamatan aktivitas antibakteri masing-masing oligomer (monomer-heksamer) menunjukkan peningkatan derajat polimerisasi berbanding lurus dengan peningkatan aktivitas inhibitor pertumbuhan bakteri. Pengujian aktivitas antibakteri COs yang diproduksi melalui hidrolisis asam terhadap *Bacillus circulans* dan *E. coli* juga dilaporkan oleh Yalpani *et al.* (1992). Disimpulkan bahwa aktivitas antibakteri COs ternyata lebih tinggi untuk bakteri *E. coli* dibandingkan dengan *B. circulans*. Hasil serupa juga dilaporkan oleh Chasanah *et al.* (2005) mengenai daya antibakteri campuran oligomer kitosan yang diproduksi dengan menggunakan enzim kitosanase dari *Bacillus licheniformis* MB-2 terhadap *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *E.*

*coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* dan *B. cereus*. Dinyatakan bahwa oligomer kitosan lebih memberikan efek penghambatan pada bakteri gram negatif.

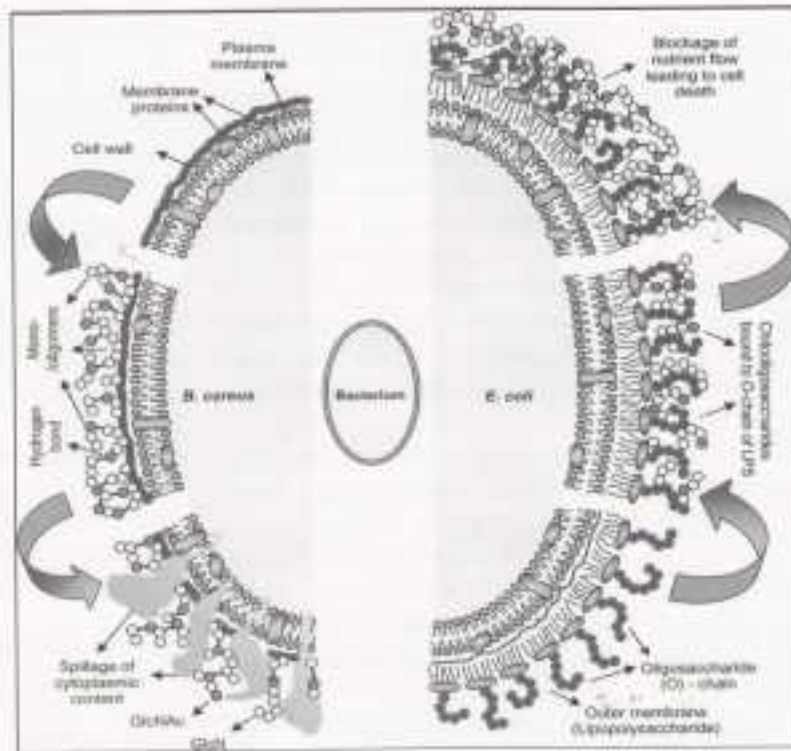
Dalam bentuk monomernya, ternyata N-glukosamin mampu menghambat pertumbuhan bakteri, sedangkan N-asetil-glukosamin tidak menunjukkan aktivitas antibakteri sama sekali. Hal ini membuktikan bahwa efek antibakteri dari COs disebabkan adanya gugus  $NH_2^+$  bebas yang dapat mengikat muatan negatif pada permukaan sel bakteri dan membawa efek antibakteri (Kittur *et al.*, 2005)

#### Mekanisme aksi bakterisidal oleh COs

Mekanisme bakterisidal dari berbagai antibakteri kationik secara umum adalah melalui interaksi dan pengrusakan struktur membran/dinding sel. Pada bakteri gram positif, membran sel tertutup dinding sel yang tersusun dari 30-40 lapisan peptidoglikan dimana



Gambar 2. SEM (Scanning Electron Microscopy) dari *B. cereus* (A, B) dan *E. coli* (C, D) sebelum dan sesudah penambahan kitosan oligosakarida (Kittur *et al.*, 2005).



Gambar 3. Model hipotetis mekanisme aksi bakterisidal oleh kitosan oligosakarida terhadap *B. cereus* dan *E. coli* (Kumar et al., 2005)

muatan positif gugus amino dari COs dapat terikat dan menyebabkan distorsi serta pemecahan dinding sel akibat shock osmotik dan eksudasi kandungan sitoplasma.

Di lain pihak, bakteri gram negatif memiliki lapisan luar membran yang mengandung lipopolisakarida dan protein, satu atau dua lapis peptidoglikan (dinding sel) dan membran sel yang terdiri dari dua lapisan lemak, protein transmembran dan inner/outer membran protein. Muatan negatif rantai-O dari lipopolisakarida berikatan dengan muatan positif gugus amino pada COs, sehingga memblokir aliran nutrisi pada bakteri yang pada akhirnya menyebabkan kematian sel. Mekanisme ini lebih baik dibandingkan mekanisme pemecahan sel, karena asosiasi yang kuat antara rantai-O dan lapisan luar membran. Semakin kecil ukuran COs dan semakin

elektronegatif bakteri gram negatif, pembentukan ikatan dan agregasi semakin efektif, pemblokiran nutrisi semakin baik dan kematian sel semakin cepat.

Hasil SEM (Scanning Electron Microscopy) dari *B. cereus* dan *E. coli* sebelum dan sesudah pemberian COs ditunjukkan pada Gambar 2 dan model hipotetis dari kedua mekanisme bakterisidal di atas disajikan pada Gambar 3.

### KESIMPULAN

Produksi kitosan oligosakarida (COs) secara efektif dan seragam dapat dilakukan melalui proses hidrolisis enzimatis. Enzim yang umum digunakan adalah kitosanase dan enzim-enzim hidrolase yang beredar secara komersial di pasaran.

Kitosan oligosakarida (COs) mempunyai aktivitas sebagai antibakteri. Pada bakteri gram

positif, COs dapat menyebabkan lisisnya membran sel bakteri. Sementara pada bakteri gram negatif, COs memblokir aliran nutrisi yang berdampak pada kematian sel.

### DAFTAR PUSTAKA

- Allan, G.G., Peyron, M. 1995. Molecular weight manipulation of chitosan I: kinetics of depolymerization by nitrous acid. *Carbohydrate Research* 277: 257-272
- Cabrera, J.C., Cutsem, P.V. 2005. Preparation of chito-oligosaccharides with degree of polymerization higher than 6 by acid or enzymatic degradation of chitosan. *Biochemical Engineering Journal* 25 : 165-172
- Chasanah, E., Meidina, and Suhartono, M.T. 2005. Antibacterial Potency of Chitosan Oligomer Produced by *Bacillus licheniformis* MB-2 chitosanase. Presented at the 9<sup>th</sup> Asian Food Conference. Jakarta, August 8-

- 10, 2005.
- Cheng, C. Y. And Li, Y. 2000. An *Aspergillus* chitosanase with potential for large-scale preparation of chitosan oligosaccharides. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 32 : 197-203
- Cho, Y. I., No, H.K., Meyers, S. P. 1998. Physicochemical characteristics and functional properties of various commercial chitin and chitosan products. *J. Agric. Food Chem.* 46: 3839-3843
- Choi, Y. J., Kim, E. J., Piao, Z., Yun, Y. C., Shin, Y.C. 2004. Purification and characterization of chitosanase from *Bacillus* sp. strain KCTC 0377BP and its Application for the production of chitosan oligosaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (8) : 4522-4531
- Il'ina, A.V., Varmalov, V.P., Melent'ev, A. I. and Aktuganov, G.E. 2001. Depolymerization of chitosan with a chitinolytic complex from bacteria of the genus *Bacillus* sp. 739. *Appl. Biochem. Microbiol.* 37 (2): 142-144
- Kittur, F.S., Kumar, A.B.V., Varadaraj, M.C., Tharanathan, R.N. 2005. Chitooligosaccharides preparation with the aid of pectinase isozyme from *Aspergillus niger* and their antibacterial activity. *Carbohydrate Research* 340 : 1239-1245
- Kumar, A.V.B., Gowda, L.R. and Tharanathan, R.N. 2004. Non-specific depolymerization of chitosan by pronase and characterization of the resultant product. *Eur. J. Biochem.* 271: 713-723
- Kumar, A.V.B., Varadaraj, M.C., Gowda, L.R. and Tharanathan, R. N. 2005. Characterization of chitooligosaccharides prepared by chitosan analysis with the aid of papain and pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 391: 167-175
- Kuo, C.H., Chen, C.C. and Chang, B. H. 2004. Process characteristics of hydrolysis of chitosan in a continuous enzymatic membrane reactor. *J. Food Sci.* 69 (7): p. 332-337
- Oktavia, D.A., Wibowo, S. dan Fawzya, Y.N. 2005. Pengaruh jumlah monokloro asetat terhadap karakteristik karboksimetil kitosan dari kitosan cangkang dan kaki rajungan. *J. Penel. Perik.* 11 (4): p. 79-88
- Shimosaka, M., Kumehara, M., Xiao-Yong, Z., Nogawa, M. and Okazaki, M. 1996. Cloning and characterization of chitosanase gene from the plant pathogenic fungus *Fusarium solani*. *J. of Fermentation and Bioengineering* 82(5): p. 426-431
- Suryaningrum, T.H., Basmai, J. dan Aumeilia, W. 2005. Pengaruh konsentrasi asam monokloro asetat dan jenis pelarut sebagai bahan pengendap terhadap produksi karboksimetil kitin. *J. Penel. Perik.* 11 (4) : p. 89-100
- Yalpani, M., Johnson, F., Robinson, LE. 1992. Antimicrobial activity of some chitosan derivatives. *In* Brine, C.J., Sanford, P.A., Zikakis, JP. (Eds). *Advances in Chitin and Chitosan*. Elsevier Science Publishers Ltd. England. 685 pp.