

hidrogen sehingga gugus amidanya berubah menjadi amina bebas. Prinsipnya adalah hidrolisis amida dalam larutan basa yang meliputi dua tahap yaitu adisi  $\text{OH}^-$  dan eliminasi yang disertai serah terima proton.

Residu yang diperoleh dicuci dengan akuades hingga pH netral kemudian dikeringkan dalam inkubator pada suhu  $50\text{ }^\circ\text{C}$  selama 16 jam.

#### 4.2 Uji Antibakteri Kitosan

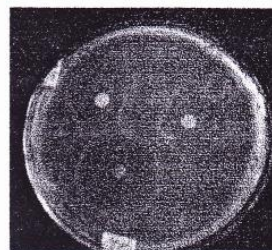
Larutan kitosan disiapkan dengan menambahkan asam asetat 1N, karena kitosan dapat larut dalam asam tersebut. Seperti telah diketahui bahwa asam asetat mempunyai daya hambat terhadap mikroba, sehingga daerah penghambatan pertumbuhan bakteri dari asam asetat digunakan sebagai kontrol. Daerah penghambatan dari asam asetat digunakan untuk mengurangi daerah penghambatan oleh kitosan.

Bakteri yang digunakan dalam uji ini adalah bakteri patogen, yaitu *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus* yang merupakan bakteri gram positif. Uji antibakteri dilakukan dengan metode difusi cakram kertas, karena metode ini cukup sederhana dan sering digunakan serta efektif untuk mengetahui aktivitas antibakteri (Brooks *et al.*, 2005). Cakram kertas yang digunakan berdiameter 0,55 cm.

Pada percobaan yang dilakukan oleh Linawati Hardjito (2002), yaitu aplikasi kitosan sebagai pengawet ikan, konsentrasi kitosan sebesar 1,5% dapat mengurangi kerumunan lalat. Hal ini menunjukkan bahwa proses perusakan oleh bakteri juga kecil. Berdasarkan penelitian tersebut, konsentrasi terbesar yang digunakan dalam penelitian ini adalah 1,5% dan dibuat variasi konsentrasi yaitu 1%; 0,5%; 0,25% dan

0,125%. Hasil pengamatan yang diperoleh bahwa kemampuan penghambatan kitosan berbeda untuk masing-masing bakteri uji. Daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri dapat diamati pada zona penghambatan (daerah bening) yang diukur sebagai satuan luas. Perlakuan kontrol dengan asam asetat sebagai pelarut memberikan daya hambat terhadap bakteri, sehingga luas zona penghambatan ini digunakan sebagai faktor pengurang untuk zona penghambatan oleh larutan kitosan.

Hubungan antara konsentrasi kitosan dengan luas zona hambat rata-rata pada waktu inkubasi 24 jam pada bakteri *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus* dapat ditunjukkan oleh grafik pada gambar 4.2. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi optimal kitosan untuk dapat menghambat bakteri *B. subtilis* dan *S. aureus* adalah 1%. Jika konsentrasi dinaikkan lagi maka tidak akan memberikan pengaruh yang signifikan. Hal ini dapat dijelaskan dengan alasan bahwa konsentrasi merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi kerja suatu disinfektan (antibakteri). Pada umumnya keefektifan kerjanya berhubungan secara eksponensial dengan konsentrasi (Irianto, 2006). Jadi bila konsentrasi dinaikkan setelah melampaui suatu konsentrasi tertentu maka peningkatan daya disinfeksi akan berkurang, sehingga tidak ada gunanya menaikkan konsentrasi.



a. Bakteri *Bacillus subtilis*