

## PENGGUNAAN KITOSAN ALAMI HASIL ISOLASI SEBAGAI PENGAWET DAN SIFAT TOKSIK BERDASARKAN UJI SITOTOKSISITAS DENGAN METODE *BRINE SHRIMP LETHALITY*

Ridwanto,<sup>1\*</sup> Gabena Indrayani Dalimunthe,<sup>2</sup> Anny Sartika Daulay<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup>Fakultas Farmasi, Program Studi Farmasi Universitas Muslim Nusantara Al Washliyah

\*Korespondensi : [ridwanto@umnaw.ac.id](mailto:ridwanto@umnaw.ac.id)

### ABSTRAK

Kitosan adalah suatu polisakarida berbentuk linier yang terdiri dari monomer N-asetilglukosamin (GlcNAc) dan D-glukosamin (GlcN). Kitosan merupakan polimer yang merupakan produk derivatif deasetilasi dari kitin. Sedangkan kitin merupakan jenis polisakarida terbanyak ke dua di bumi setelah selulosa dan bersumber dari cangkang Crustaceae sp., yaitu udang, lobster, kepiting, hewan bercangkang lainnya. Kitosan memiliki bentuk yang unik dan bermanfaat bagi pangan, agrikultur dan medis. Pada penelitian tahap I telah dilakukan penggunaan kitosan pada pengawetan buah *strawberry* (*Fragaria chiloensis* L.) yang berasal dari Brastagi untuk memperpanjang waktu simpan, mempertahankan nilai gizi, menghasilkan buah *strawberry* yang tahan lama dan aman dikonsumsi secara langsung. Tujuan penelitian pada tahap II ini adalah untuk menentukan sifat toksik kitosan alami hasil isolasi dari udang, lobster dan kepiting.

Pembuatan kitosan dilakukan dalam dua tahapan yaitu a) Pembuatan kitin: 1) Deproteinase; 2) Demineralisasi; 3) Penghilangan warna; 4) Pencucian dan pengeringan; b) Deasetilasi Kitin menjadi Kitosan. Pengujian toksisitas kitosan alami dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)* terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach dilakukan untuk menguji sifat toksik kitosan untuk membunuh sel abnormal sebagai antikanker, dimana kitosan komersial dibandingkan dengan kitosan yang berasal dari udang, kepiting dan lobster.

Data penelitian meliputi produk kitosan dari udang, kepiting dan lobster beserta perbandingannya berdasarkan LC<sub>50</sub>. Uji toksisitas memberikan data mengenai kemampuan kitosan yang dihasilkan dalam membunuh sel kanker. Tingkat kesiapan teknologi (TKT) adalah tingkat 4, sehingga masih harus diteliti lebih lanjut. Luaran penelitian ini adalah publikasi ilmiah pada jurnal nasional/internasional, publikasi pada seminar hasil penelitian dan draft buku ajar.

**Kata kunci:** kitosan, kitin, uji toksisitas, anti kanker, brine shrimp lethality test.

### 1. PENDAHULUAN

Kitosan telah dikenal sebagai bahan tambahan dalam sediaan obat, sebagai bahan pelembab dan pembuatan kontak lensa yang lunak dan bersih. Kitosan dapat menurunkan kolesterol yang didasarkan pada kemampuannya berikatan dengan lemak. Kitosan memiliki gugus aktif yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba, mempercepat penyembuhan luka bakar, luka/gangren penderita diabetes, dan antioksidan (Rahayu dan Purnavita, 2007; Hargono dan Sumantri, 2008).

Kitosan juga memiliki sifat sebagai

antioksidan yang didasarkan pada kemampuan menangkap radikal bebas *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)* (Yen dkk, 2008). Menurut Xie, dkk (2001) mekanisme antioksidan yang terbentuk yaitu adanya pengikatan radikal bebas oleh kitosan, gugus radikal OH<sup>+</sup> dari proses oksidasi lipida dapat bereaksi dengan ion hidrogen dari gugus ion ammonium (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) pada kitosan sehingga menghasilkan suatu molekul yang lebih stabil dan menghasilkan senyawa antioksidan. Berdasarkan penelitian Hasegawa, dkk (2001), kitosan dapat membunuh sel tumor dengan cara menginduksi apoptosis sel tumor dengan

mengaktivasi caspase-3, lalu senyawa-senyawa antikanker ini menginduksi apoptosis menembus membran sel, berinteraksi dengan sel target dan menyebabkan kematian sel (sitotoksitas).

Prinsip untuk mengetahui suatu senyawa toksik atau memiliki kemampuan sitotoksik dapat dilakukan uji toksitas. Secara *in vivo*, kematian suatu hewan percobaan dapat dipakai sebagai alat pemantau penapisan awal ketoksikan suatu zat kimia aktif suatu bahan alam terhadap ekstrak, fraksi maupun isolat (Mclaughlin dan Rogers, 1998). Salah satu metode yang digunakan untuk menentukan ketoksikan senyawa adalah *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach. *Artemia salina* Leach ini merupakan organisme sederhana, mudah berkembang biak dan menetas dalam kondisi normal laboratorium (Ruwaida, 2010).

Metode BSLT merupakan uji pendahuluan yang dapat digunakan untuk memantau senyawa bioaktif dari bahan alami. Adanya korelasi positif antara metode BSLT dengan uji sitotoksik menggunakan kultur sel kanker maka metode ini sering dimanfaatkan untuk skrining senyawa antikanker (Ramdhini, 2010). Berdasarkan Penelitian Meyer, dkk., (1982), Metode BSLT mempunyai kemampuan dalam mendeteksi 14 diantara 24 ekstrak etanol spesies Euphorbiaceae yang aktif terhadap uji 9-PS (sel leukimia *in vitro* pada tikus) dan kemampuannya mendeteksi 5 diantara 6 senyawa yang aktif terhadap uji sel karsinoma nasofaring.

Menurut Meyer, dkk., (1982), suatu ekstrak dapat dikatakan memiliki aktivitas antikanker dengan metode BSLT jika nilai  $LC_{50}$  kurang dari 30  $\mu\text{g/ml}$ . Sedangkan menurut Ramdhini (2010), suatu ekstrak dapat dikatakan memiliki aktivitas antikanker dengan metode BSLT jika nilai  $LC_{50}$  kurang dari 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Suatu ekstrak dapat dikatakan memiliki aktivitas antikanker dengan metode BSLT jika nilai  $LC_{50}$  berkisar antara 30  $\mu\text{g/ml}$  sampai dengan 1000  $\mu\text{g/ml}$ .

## 2. METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi UMN Al Washliyah ini dilakukan dalam 2 tahapan. Tahap I adalah a) pembuatan dan isolasi kitosan dari kulit udang, kepiting dan lobster, b) mengaplikasikan kitosan alami hasil isolasi pada tahap I menjadi pengawet secara *coating* pada buah *stawberry*. Penelitian pada tahap ke-II adalah Uji toksisitas kitosan yang dihasilkan terhadap larva udang *Artemia salina* Leach untuk menentukan aktivitasnya terhadap membunuh mikroba dan sel kanker. Metode penelitian yang digunakan pada kedua penelitian ini adalah metode eksperimen.

### *Prosedur pembuatan kitosan alami, penggunaan sebagai pengawet dan uji toksisitas*

Secara garis besar pembuatan kitosan meliputi: penghilangan protein (deproteinasi). Selanjutnya dengan penghilangan warna dilakukan dengan dicuci dengan air dan dikeringkan (terbentuk kitin). Langkah berikutnya penghilangan gugus asetil (deasetilasi) kemudian dicuci dengan air dan dikeringkan maka terbentuk produk biopolimer kintosan (Hargono, 2008). Kitosan yang dihasilkan dianalisa gugus fungsi produknya dengan menggunakan metode FTIR dan karakterisasi kitosan yang meliputi: pemeriksaan organoleptis, penetapan kadar air, penetapan kadar abu dan rendemen.

### *Prosedur Penggunaan Kitosan sebagai Pengawet pada Buah Strawberry*

Pengawetan buah *strawberry* dilakukan dengan metode *coating*. Prosedur ini dilakukan dalam dua tahap yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama. Penelitian pendahuluan dilakukan untuk mendapatkan konsentrasi kitosan dan lama perendaman dalam kitosan yang selanjutnya dilakukan dalam penelitian utama.

1. Penelitian Pendahuluan. Buah *strawberry* dengan tingkat kematangan masak penuh dicuci dan dibersihkan

terlebih dahulu dari debu dan kotoran. Kemudian buah *strawberry* ditiriskan dan dikeringkan sampai larutan kitosan pada permukaan buah *strawberry* tidak menetes lagi. Buah *strawberry* disimpan pada suhu ruang selama 1(satu) minggu dan diberi alas plastik bening berwarna putih, dan selanjutnya ditimbang untuk mengetahui berat buah *strawberry* setelah dilapisi kitosan. Analisis terhadap buah *strawberry* yang telah disimpan meliputi kerusakan visual (penampakan) dan persentase susut bobot.

2. Penelitian utama. Buah *strawberry* dengan tingkat ketuaan yang sama dan dengan tingkat kemasakan yang berbeda dicuci dan dibersihkan terlebih dahulu dari debu dan kotoran. Kemudian buah *strawberry* dikeringkan dengan menggunakan kain bersih atau tisu. Buah *strawberry* dicelupkan ke dalam larutan kitosan 1% dengan lama perendaman 10 menit. Buah *strawberry* ditiriskan dan

dikeringkan sampai larutan kitosan pada permukaan tidak menetes lagi kemudian buah *strawberry* ditimbang untuk mengetahui beratnya dan disimpan pada suhu ruang. Analisis dilakukan pada hari 0, 5, 10, 15, dan 20 penyimpanan. Analisis yang dilakukan terhadap buah *strawberry* meliputi: analisis susut bobot, total padatan terlarut, total asam, vitamin C dan uji penampakan.

### ***Pengujian Toksisitas dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)***

Uji toksisitas ini dilakukan dengan beberapa prosedur yaitu: Penetasan Telur *Artemia salina Leach*. Pembuatan larutan uji dengan berbagai konsentrasi: 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml, 1000 µg/ml. Uji toksisitas Analisis data

*Tabel 1. Pengamatan 24 jam larva Artemia salina Leach terhadap kitosan udang*

No	Konsentrasi Uji (µg/ml)	Log Konsentrasi	Jumlah Larva Uji (ekor)	Jumlah Larva yang mati			Persen Kematian (%)	Nilai Probit
				1	2	3 rata-rata		
1	Blanko	0	10	0	0	0	0%	-
2	100	2	10	0	1	0,33	3.3%	3.162
3	250	2.3979	10	1	0	1,0	6.6%	3.494
4	500	2.6989	10	2	1	1,33	13.3%	3.888
5	750	2.8750	10	3	2	2	20%	4.168
6	1000	3	10	2	2	3,33	23.3%	4.271
LC50 = 4369.180634								

*Tabel 2. Pengamatan 24 jam larva Artemia salina Leach terhadap kitosan kepiting*

No	Konsentrasi Uji (µg/ml)	Log Konsentrasi	Jumlah Larva Uji (ekor)	Jumlah Larva yang mati			Persen Kematian (%)	Nilai Probit
				1	2	3 rata-rata		
1	Blanko	0	10	0	0	0	0%	-
2	100	2	10	1	0	0,33	3.3%	3.1616
3	250	2.3979	10	1	1	0,66	6.6%	3.4937
4	500	2.6989	10	1	1	1,33	13.3%	3.8877
5	750	2.8750	10	2	1	1,66	16.6%	4.0299
6	1000	3	10	3	2	2,66	26.6%	4.375
LC50 = 4383.287934								

Berdasarkan Tabel 5.1 dan 5.2 kemudian dibuat kurva untuk menunjukkan korelasi antara persentase kematian log konsentrasi untuk menentukan LC50. Persamaan garis yang diperoleh dari sampel kitosan udang adalah  $y = 1.1504x + 0.182$ ,  $R^2 = 0.9866$ . Berdasarkan diperoleh nilai LC50 pada probit (Y) = 5, konsentrasi (X) adalah 4369.180634  $\mu\text{g/ml}$  dan Persamaan

larva dan kitosan udang dan kitosan kepiting . Persamaan regresi linier dari grafik di atas kemudian digunakan garis yang diperoleh dari sampel kitosan kerang tahu adalah  $y = 1.1555x + 0.7918$ ,  $R^2 = 0.967$ . Berdasarkan diperoleh nilai LC50 pada probit (Y) = 5, konsentrasi (X) 3,6414 adalah 4383.287934  $\mu\text{g/ml}$ .

Tabel .3 Pengamatan 24 jam larva *Artemia salina* Leach terhadap kitosan lobster

No	Konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ )	Perlakuan 1		Perlakuan 2		Perlakuan 3		Jlh larva yang mati	Rata-rata % mortalitas
		Larva mati	% Mortalitas	Larva mati	% Mortalitas	Larva mati	% Mortalitas		
1	Blanko	0	0	0	0	0	0	0	0 %
2	100	0	0	1	10	0	1	1	3,3 %
3	250	0	0	1	10	1	10	2	6,7 %
4	500	2	20	1	10	0	0	3	10,0 %
5	750	1	10	2	20	2	20	5	16,7 %
6	1000	2	20	2	20	4	40	8	26,7%

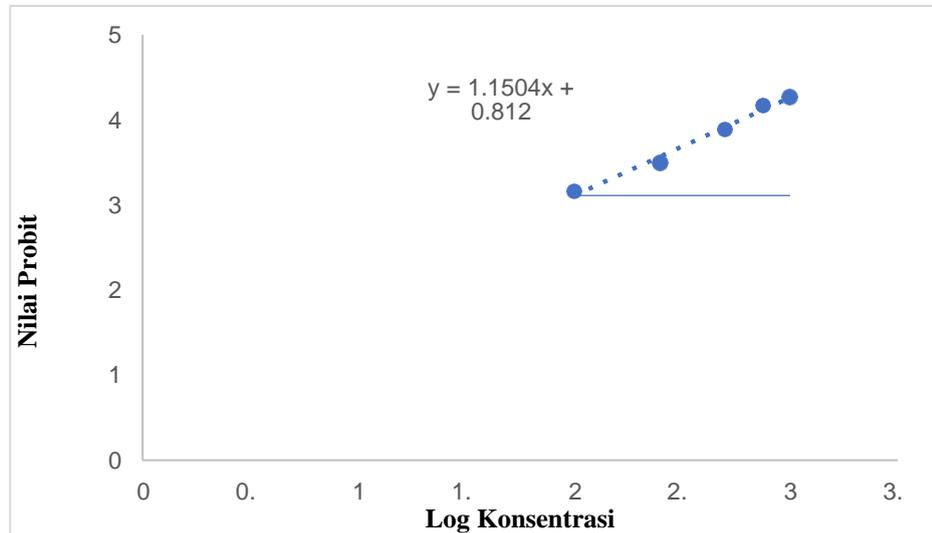
Berdasarkan data diatas jumlah larva yang digunakan tiap perlakuan adalah 10 ekor larva dengan 3 kali perlakuan, sehingga total 30 ekor untuk satu konsentrasi. Dari data diatas dapat diketahui konsentrasi yang rendah 100 $\mu\text{g/ml}$  ke konsentrasi yang paling tinggi yakni 1000 $\mu\text{g/ml}$  dengan persentase mortalitas sebesar 3,3 % – 26,7 %.Sedangkan pada blanko tidak memberikan mortalitas terhadap larva.Konsentrasi yang bervariasi pada setiap vial uji memiliki jumlah kematian *Artemia salina* yang beragam jumlahnya. Hal tersebut menunjukkan bahwa setiap konsentrasi memiliki pengaruh yang berbeda pada kematian larva *A.salina*, semakin tinggi konsentrasi yang dibuat maka tinggi pula kematian larva (Supriningrum *et al.*, 2017). Berdasarkan data diatas jumlah larva yang digunakan tiap perlakuan adalah 10 ekor larva dengan 3 kali perlakuan, sehingga total 30 ekor untuk satu konsentrasi. Dari data diatas dapat diketahui konsentrasi yang rendah 100 $\mu\text{g/ml}$  ke konsentrasi yang paling tinggi yakni 1000 $\mu\text{g/ml}$  dengan persentase mortalitas sebesar 3,3 % – 26,7 %.Sedangkan pada blanko tidak

memberikan mortalitas terhadap larva.Konsentrasi yang bervariasi pada setiap vial uji memiliki jumlah kematian *Artemia salina* yang beragam jumlahnya. Hal tersebut menunjukkan bahwa setiap konsentrasi memiliki pengaruh yang berbeda pada kematian larva *A.salina*, semakin tinggi konsentrasi yang dibuat maka tinggi pula kematian larva (Supriningrum *et al.*, 2017).

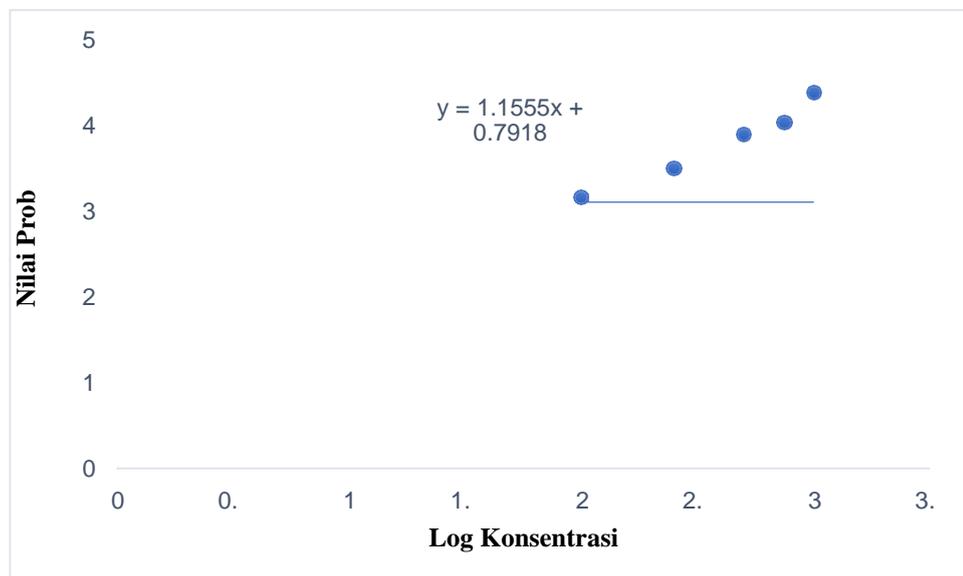
Data yang diperoleh dari tabel diatas, kemudian dianalisis dengan menggunakan tabel analisa probit untuk mendapatkan nilai LC<sub>50</sub>. *Lethal concentration 50* (LC<sub>50</sub>) merupakan besarnya konsentrasi yang dapat membunuh hewan percobaan sebanyak 50% dari keseluruhannya. Nilai LC<sub>50</sub> dapat dihitung dengan persamaan regresi garis lurus tersebut dengan memasukkan nilai (probit 50% kematian hewan uji) sebagai y sehingga dihasilkan x sebagai nilai log konsentrasi. Antilog nilai x yang nantinya menjadi parameter nilai LC<sub>50</sub> yang ditunjukkan untuk mengetahui adanya aktivitas biologis pada suatu senyawa terhadap hewan uji ialah dengan menghitung jumlah larva yang mati karena pengaruh pemberian senyawa dengan konsentrasi

yang telah ditentukan (Wahyu Ningdyah *et al.*, 2015). Analisis probit dapat diketahui grafik persamaan garis lurus  $y = 1,1293x + 0,8287$  dari data hasil toksisitas kitosan kulit udang vaname sedangkan analisa

probit pada kitosan kulit windu diperoleh grafik persamaan garis lurus  $y = 1,0472x + 1,1268$ .



Gambar 1. Kurva korelasi persentase kematian larva dengan kitosan kerang hijau log konsentrasi



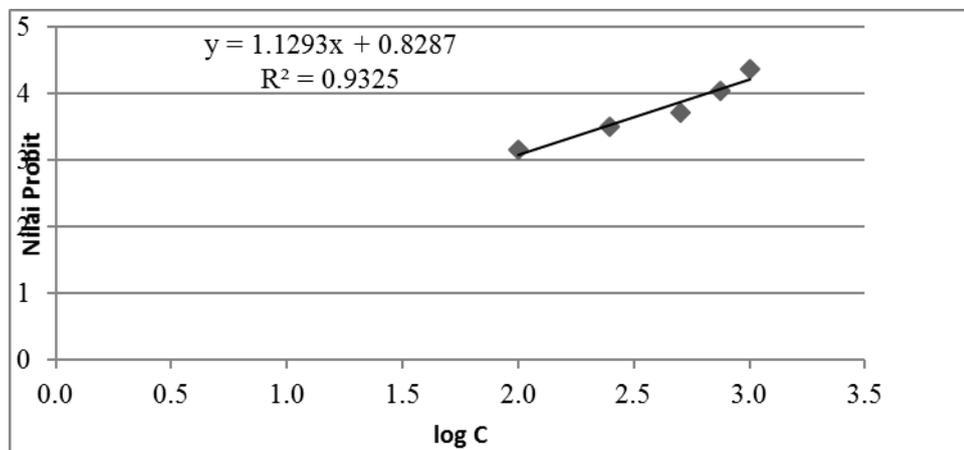
Gambar 2. Kurva korelasi persentase kematian larva dengan kitosan kerang tahu log konsentrasi

Seperti terlihat pada Gambar 4.1 dan 4.2, nilai konsentrasi kitosan

berbanding lurus dengan mortalitas persentase larva *Artemia Salina* Leach. Adanya uji larva dalam pengendalian adalah untuk

mengetahui persentase kematian larva *Artemia Salina* Leach yang disebabkan oleh kematian alami. Menurut Meyer *et al.*, (1982), senyawa menunjukkan aktivitas toksisitasnya dalam BSLT jika senyawa tersebut dapat menyebabkan 50% kematian hewan pengujian pada konsentrasi kurang dari 1000 ppm. Berdasarkan pernyataan tersebut, dapat disimpulkan bahwa kitosan adalah tidak beracun karena nilai

LC<sub>50</sub> lebih dari 1000 ppm. Kitosan udang mencapai LC<sub>50</sub> pada 4369.180634 µg/ml dan kitosan kepiting mencapai LC<sub>50</sub> pada 4383.287934 µg/ml. Hasilnya membuktikan bahwa kitosan tidak beracun.



Gambar 3. Grafik Regresi Linear Konsentrasi Kitosan Vaname (*Litopenaeus vannamei*) Terhadap Nilai Probit

Grafik diatas menunjukkan log konsentrasi terhadap nilai probit yang disapat dari persentase kematian larva. Setelah itu dimasukkan nilai y yakni nilai probit 50%

hewan uji dan didapatkan nilai  $x = 3,69362$  maka nilai LC<sub>50</sub> antilog yaitu 4897,79 µg/ml.

#### 4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil pengujian toksisitas kitosan alami udang, kepiting, dan lobster dengan metode BSLT menyatakan bahwa kitosan alami tersebut

bersifat tidak beracun dengan nilai LC<sub>50</sub> > 1000 ppm.

Diharapkan kepada peneliti selanjutnya untuk melakukan uji toksisitas dengan menggunakan metode yang berbeda selain BSLT dan juga mengkombinasikan suhu

serta konsentrasi pelarut yang digunakan agar dilihat perbandingan derajat deasetilasi dan karakterisasinya

## DAFTAR PUSTAKA

- Agustina, S dan Kurniasih, Y. (2013). *Pembuatan Kitosan Dari Cangkang Udang Dan Aplikasinya Sebagai P Absorben Untuk Menurunkan Kadar Logam CU*. IKIP. Mataram.
- Emslie.S.(2003). *Artemia salina Leach. Brine Shrimp-Ses Monkeys*.[http://www.animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Artemia\\_salina.html](http://www.animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Artemia_salina.html)
- Kanwar, A.S. (2007). Brine Shrimp (*Artemia salina*) a Marine Animal for Simple and Rapid Biological Assays. *Chinese Clinical Medicine* 2 (4); page 35-42
- Khan T.A., Peh K, K., and Hung S.C. (2002). Reporting Degree of Deacetylation Values of Chitosan : the Influence Analytical Methods, *J Pharm Pharmaceut Sci*. Malaysia; page 207
- Priyanto. (2009). *Mekanisme Toksikologi; Terapi Antidotum dan Penilaian Resiko*. Lembaga Studi dan Konsultasi Farmakologi Indonesia (LESKONFI). Depok.
- Rachmania, D. (2011). *Karakteristik Nano Kitosan Cangkang Udang Vannamei (Litopenaeus vannamei) dengan Metode Gelasi Ionik*. Skripsi. IPB Bogor:
- Ramdhini, R.N. (2010). *Uji Toksisitas Terhadap Artemia salina Leach. dan Toksisitas Akut Komponen Bioaktif Pandanus conoideus var. Conoideus Lam. Sebagai Kandidat Antikanker*. Skripsi. Fakultas MIPA Universitas Sebelas Maret. Surakarta
- Sugita P., Wukirsari, T., Sjahriza A., Wahyono, D.,(2009). *Kitosan, Sumber Biomaterial Masa Depan*. Institut Teknologi Bandung Press, Bandung. Hal 30
- Wibowo S., Utomo,B,S,B., Ningrum T,D,S., dan Syamsidi. (2013). *Artemia untuk Pakan Ikan dan Udang*. Penebar Swadaya. Jakarta Timur.
- Yen, M.T., Yang, J.H., dan Mau, J.L., (2008). Antioxidant Properties Of Chitosan From Crabs Shells, *In Carbohydrate Polymers Journal*, Elsevier; Hal 840- 844
- Yurnaliza. (2002). *Senyawa Kitin dan Kajian Aktivitas Enzim microbial*. Digitezed Library USU. Medan; Hal 1-12
- Xie, W. P. Xu dan. Q. Liu. 2001. Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 11; page 1699-1701.
- Zahiruddin, (2008). *Karakteristik Mutu dan Kelarutan Kitosan dari Ampas Silase Kepala Udang Windu (Penaeus monodon)*. Buletin Teknologi Hasil Perikanan vol 11 No 2. IPB