

PREPARASI DAN MODIFIKASI KIMIA STRUKTUR KITOOLIGOSAKARIDA-2,5-ANHIDRO-D-MANNOFURANOSA (KOSAMF) DARI KITOSAN SERTA UJI ANTIBAKTERI TERHADAP *Staphylococcus aureus* DAN *Escherichia coli*

Emil Salim*, Hasnirwan, Sanusi Ibrahim, Afrizal

Jurusan Kimia Fakultas Universitas Andalas, Padang 25163 Indonesia

*Email: salim_emil17@yahoo.com

ABSTRACT

Chitooligosaccharide with a 2,5-anhydro-D-mannofuranose unit at the reducing end (COSamf) was prepared in certain degree of polymerization \overline{DP} by nitrous deamination of a partial *N*-deacetylated chitosan. COSamf was then modified into COSamf derivative by functionalizing its 2,5-anhydro-D-mannofuranose (amf) unit. Therefore, one-pot reductive amination of COSamf in ammonium acetate buffer by 2,5-dichloroaniline and NaBH₃CN was applied. This route was effective to generate antibacterial COSamf derivative in high yield. The structure of synthesized COSamf derivative was characterized by FT-IR and NMR spectroscopies. COSamf derivative has antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* with diameter zone of inhibition 12,5 mm and 10,5 mm, respectively.

Keywords: *chitosan, chitooligosaccharide-2,5-anhydro-D-mannofuranose, reductive amination, antibacterial*

PENDAHULUAN

Kitosan merupakan polisakarida rantai lurus dari β -(1 \rightarrow 4) linked 2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose (GlcNAc) dan 2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose (GlcN) units. Polisakarida ini diperoleh dari proses deasetilasi kitin, sebuah struktur polisakarida yang terdapat pada kulit luar artropoda dan dinding sel jamur^[1-2]. Tidak seperti kitin, kitosan dapat larut dalam air pada kondisi asam. Kitosan dapat digambarkan dan diklasifikasikan berdasarkan derajat N-asetilasi (DA), derajat polimerisasi (DP) dan pola N-asetilasi (PA)^[3].

Kitooligosakarida (KOS) adalah homo atau heterooligomer dari unit GlcN dan/atau unit GlcNAc. KOS ini juga dapat didefinisikan sebagai kitosan yang memiliki berat molekul rata-rata hingga $\sim 4,000$ g/mol^[4-5]. KOS dapat diperoleh dengan cara menhidrolisis kitosan/kitin menggunakan enzim atau asam. Parameter struktur KOS yang dihasilkan, seperti DA dan PA, tergantung pada jumlah asam yang ditambahkan atau jenis enzim

spesifik yang digunakan^{[1][3][5]}. Karena memiliki sifat biologi dan fisika-kimia yang menarik, Kito-oligosakarida dapat digunakan dalam berbagai aplikasi, mulai dari produk obat-obatan dan kosmetik sampai kepada water treatment dan perlindungan tanaman^[5-6]. Untuk aplikasi-aplikasi ini, sifat-sifat yang berbeda dari kito-oligosakarida, seperti antibakteri, antijamur, antitumor, peningkatan daya tahan tubuh pada hewan dan anti-HIV menjadi daya tarik yang tinggi untuk diteliti. Beberapa penelitian sudah menunjukkan bahwa sifat-sifat tersebut tergantung pada parameter struktur DA dan PA^[7].

Kitooligosakarida-2,5-anhidro-D mannofuranosa (KOSamf) merupakan jenis kitooligosakarida (KOS) yang diperoleh dari kitosan melalui proses nitrous deaminasi. Perbedaan struktur mendasar bahwa KOSamf memiliki gugus fungsi aldehyd pada rantai ujung strukturnya. Gugus fungsi aldehyd pada struktur ujung rantai KOSamf akan menjadi pusat investigasi dalam penelitian ini. Dengan kehadiran gugus ini, maka

modifikasi struktur KOSamf dilakukan untuk mendapatkan senyawa turunan KOSamf yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri.

METODOLOGI PENELITIAN

Bahan Kimia

Kitosan, Ammonium asetat, 3,5-dikloroanilin, NaBH_3CN , NH_4OH , NaNO_2 , asam asetat glasial, HCl , etanol, aquades.

Peralatan

Alat-alat gelas (erlenmeyer, gelas piala, tabung reaksi, corong, gelas ukur, labu evaporator, corong pisah, pipet takar, pipet tetes, botol vial), *autoclave*, *sentrifugator*, neraca analitik, hot plate, lemari asam, *freezer*, *freeze drying*, rak tabung reaksi, *syringe filter*, *FT-IR (Infrared Spectrofotometer Perkin Elmer Spectrum One)*, $^1\text{H-NMR}$.

Persiapan Larutan Buffer Ammonium Asetat (0.15 M, pH 4.5)

Sebanyak 100 mL asam asetat glasial dan 116 gram ammonium asetat dilarutkan dalam 10 L aquades. Larutan disaring dengan filter millipore.

Nitrous Deaminasi dari Kitosan (rasio $\text{GlcN}/\text{NaNO}_2 = 10$)

Sebanyak 4,67 gram kitosan ditimbang dan dicampurkan dengan 200 mL aquades dalam erlenmeyer 500 mL. Setelah itu, campuran ditambahkan 2,56 mL HCl 37% dan diaduk selama 12 jam. Sebanyak 0,2 gram NaNO_2 dilarutkan dalam 5 mL aquades, kemudian ditambahkan ke dalam campuran sebelumnya dan diaduk selama 24 jam. Setelah 24 jam, larutan disaring dengan kapas dan kemudian ditambahkan NH_4OH sampai pH sekitar 9. Larutan diendapkan menggunakan sentrifugator (20 menit, 22°C , 4000 rpm), kemudian endapan yang diperoleh dicuci dengan aquades sampai pH netral. Produk dikeringkan menggunakan *freeze dryer*. $^1\text{H-NMR}$ dilakukan untuk mengkonfirmasi derajat polimerisasi dan struktur dari oligomer yang diperoleh^[8].

Reaksi Aminasi Reduktif KOSamf dengan 3,5-dikloroanilin

KOSamf (0.14 mmol unit amf) dilarutkan dalam 20 mL bufer asetat (pH 4,5) dan pH disesuaikan menjadi 5,5 dengan menambahkan NH_4OH . 3,5-dikloroaniline (10 equiv) dilarutkan dalam 10 mL etanol absolut dan kemudian ditambahkan ke larutan sebelumnya. Campuran ini diaduk selama 30 menit. *Sodium cyanoborohydride* (NaBH_3CN) (10 equiv) ditambahkan ke dalam campuran dan kembali diaduk selama 48 jam pada suhu 40°C . Produk diendapkan dengan menambahkan NH_4OH sampai pH basa (pH~8). Hasil endapan disentrifus (20 menit, 22°C , 4000 rpm) dan dicuci dengan air/etanol (50:50) sebanyak 5 kali. Produk dikeringkan dengan *freeze drying*. $^1\text{H-NMR}$ dilakukan untuk mengkonfirmasi derajat polimerisasi dan struktur dari oligomer yang diperoleh setelah proses modifikasi^[8].

Uji Antibakteri KOSamf Sebelum dan Sesudah Modifikasi

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan terhadap bakteri patogen, yaitu *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan menggunakan metode difusi agar (*Diffusion Assay*). Aktivitas ditunjukkan dengan adanya zona bening atau halo di sekitar *paper disc* yang sebelumnya telah ditetesi sampel KOSamf dan turunan KOSamf. Sebagai kontrol positif digunakan kloramfenikol, dan pelarutnya sebagai kontrol negatif^[9].

HASIL DAN DISKUSI

Karakterisasi KOSamf dan Turunan KOSamf

Karakterisasi dengan FT-IR.

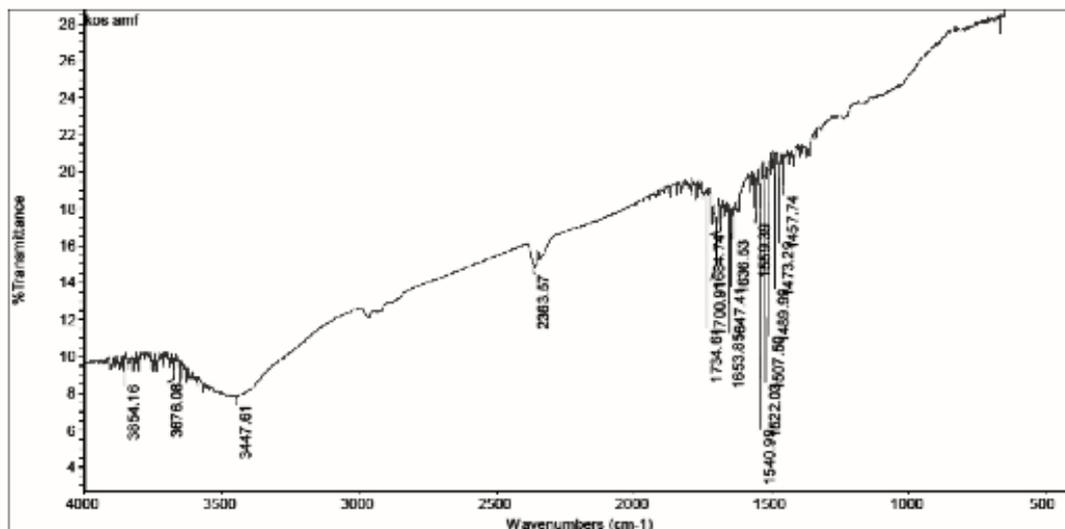
Analisis spektrum FT-IR untuk KOSamf dilakukan pada daerah gugus fungsi dan daerah sisik jari dengan frekuensi 4000 cm^{-1} – 500 cm^{-1} (Gambar 1). Berdasarkan hasil analisa gugus fungsi dengan FT-IR, diketahui KOSamf mempunyai gugus $-\text{NH}$ yang ditandai dengan munculnya serapan pada bilangan gelombang 3676 cm^{-1} . Serapan khas untuk kitosan yang terdapat pada bilangan gelombang $3447,61\text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan

adanya ikatan hidrogen dari gugus -OH yang tumpang tindih dengan rentangan -NH . KOSamf ini masih memiliki gugus asetil yang ditandai dengan munculnya serapan pada bilangan gelombang 1680-1660 cm^{-1} yang menandakan adanya gugus =CO dan bilangan gelombang 2900 cm^{-1} yang menandakan adanya vibrasi ulur gugus -CH_3 . Selain itu, munculnya serapan pada bilangan gelombang 1790-1700 cm^{-1} menandakan adanya gugus =CO dari aldehyd. Hal ini menunjukkan bahwa sudah terbentuknya gugus anhidro-D-mannofuranosa (amf) pada kitosan.

Karakterisasi dengan pereaksi Tollens.

Untuk memastikan terbentuknya gugus anhidro-D-mannofuranosa pada kitosan,

maka dilakukan tes menggunakan pereaksi spesifik untuk senyawa aldehyd. Ketika pereaksi *Tollens* ditambahkan ke dalam sampel KOSamf terbentuk larutan berwarna perak. Hal ini menandakan adanya gugus aldehyd pada struktur KOSamf yang diperoleh dari kitosan. Pada umumnya, pereaksi akan menghasilkan endapan berwarna perak, akan tetapi pada tes yang dilakukan hanya menghasilkan koloid berwarna perak (Gambar 2). Ini mungkin disebabkan oleh jumlah gugus aldehyd yang ada tidak terlalu signifikan apabila dibandingkan dengan struktur kitooligosakarida yang sangat panjang.



Gambar 1. Spektrum FT-IR Kitooligosakarida-2,5-anhidro-D-mannofuranosa(KOSamf) pada plat KBr



Gambar 2. Uji sampel dengan pereaksi Tollens.

Karakterisasi dengan $^1\text{H-NMR}$

Struktur kimia dari senyawa KOSamf dikonfirmasi dengan NMR. Seperti terlihat pada Gambar 3, spektrum $^1\text{H-NMR}$ dari senyawa KOSamf menunjukkan gugus fungsi aldehyd pada unit amf yang muncul sebagai geminal diol dalam pelarut air.

Derajat polimerisasi dari sampel KOSamf dapat ditentukan dengan menggunakan analisa $^1\text{H-NMR}$. Derajat polimerisasi dapat dihitung dengan membandingkan integrasi

proton H-3 dari amf dengan proton H-2 dari unit GlcN (Gambar 3), berdasarkan rumus:

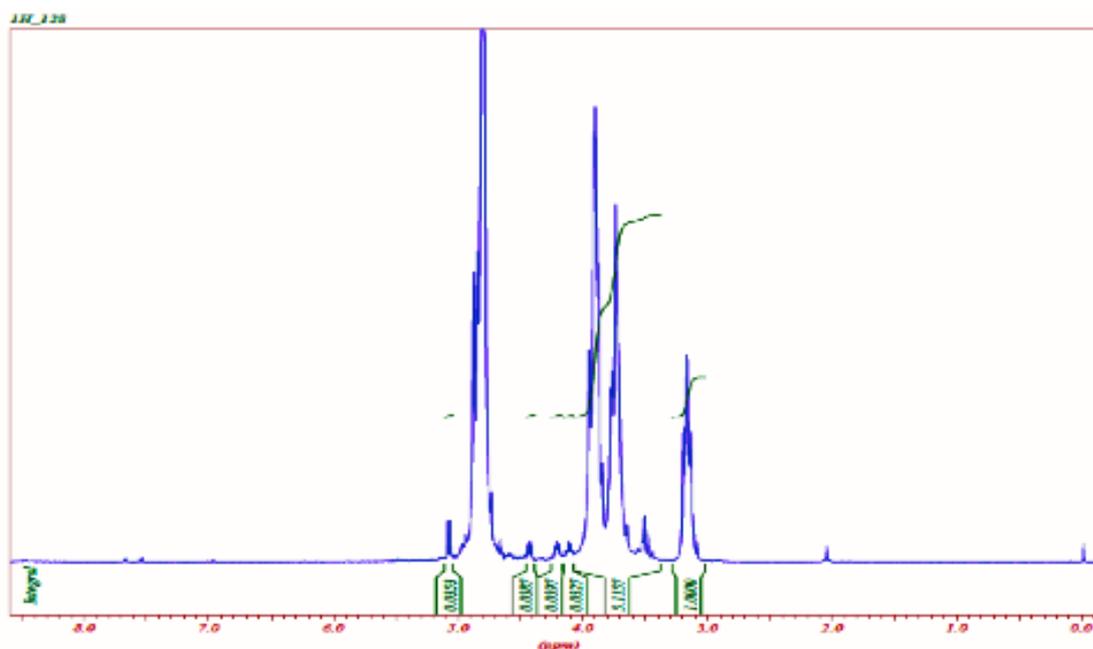
$$\frac{DP}{DP} \frac{\text{integrasi H} - 2 \text{ (unit GlcN)}}{\text{integrasi H} - 3 \text{ (unit amf)}}$$

Berdasarkan analisis $^1\text{H-NMR}$, integrasi H-3 unit amf adalah 0,0387 dan H-2 unit GlcN adalah 1,000, maka nilai Derajat Polimerisasi rata-rata dari senyawa KOSamf adalah 26.

Uji Antibakteri dari KOSamf dan Turunan KOSamf

Pada penelitian ini, senyawa KOSamf dan turunannya diuji kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan beberapa bakteri patogen (*Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*) yang merupakan penyebab penyakit saluran pencernaan pada manusia. Secara umum senyawa KOSamf dan turunannya mampu menghambat pertumbuhan kedua bakteri uji. Hasil aktivitas antibakteri ini ditunjukkan pada Tabel 1 dan 2.

E. coli merupakan bakteri gram negatif, sedangkan *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif. Dari hasil yang tertera pada gambar dapat dilihat bahwa KOSamf yang diuji secara umum mampu menghambat bakteri uji baik itu gram positif maupun gram negatif dengan daya hambat sedang (antara 8 – 12,5 mm) dan kuat (besar dari 11 mm). Daya hambat isolat terhadap *Staphylococcus aureus* secara umum lebih besar dibanding daya hambat terhadap *E. coli*. Diameter zona hambat terhadap bakteri uji yang tergolong gram positif rata-rata lebih besar dibanding rata-rata diameter zona hambat terhadap bakteri yang tergolong gram negatif. Bakteri gram negatif lebih resisten terhadap antimikroba dibanding dengan bakteri gram positif karena mempunyai beberapa mekanisme resistensi, diantaranya sifat *barrier* permeabilitas alami pada lapisan bagian luarnya yang memperlambat masuknya senyawa antimikroba, serta mekanisme spesifik resistensi yang menginaktifkan senyawa tersebut sehingga mencegahnya menembus membran sitoplasma atau mencegah pengikatan pada sisi intraseluler.



Gambar 3. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, 20°C dalam D_2O) dari senyawa KOSamf (rasio GlcN/ $\text{NaNO}_2 = 10$)

Tabel 1. Hasil Pengukuran Lebar Daerah Hambat (LDH) senyawa KOSamf terhadap bakteri *E. coli* dan *Staphylococcus aureus*

No	Konsentrasi Sampel mg/L	Lebar Daerah Hambat (mm)	
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
1	0,100	8,5	8,5
2	0,125	8,5	9,5
3	0,250	8,5	12,5
4	0,500	9,5	11,5
5	1,000	9,5	10,5
6	Kontrol (+)	44,0	37,0
7	Kontrol (-)	5,0	5,0

Kontrol positif : *Gentamycin* 40 mg/L
 Kontrol negative : DMSO 0,1%

Tabel 2. Hasil Pengukuran Lebar Daerah Hambat (LDH) senyawa Turunan KOSamf terhadap bakteri *E. coli* dan *Staphylococcus aureus*

No	Konsentrasi Sampel mg/L	Lebar Daerah Hambat (mm)	
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
1	0,100	8,5	8,5
2	0,125	9,5	10,5
3	0,250	9,5	9,5
4	0,500	11,5	7,5
5	1,000	12,5	10,5
6	Kontrol (+)	44,0	37,0
7	Kontrol (-)	5,0	5,0

Kontrol positif : *Gentamycin* 40 mg/L
 Kontrol negative : DMSO 0,1%

Dari Tabel 1 dan 2, senyawa KOSamf memiliki bioaktivitas yang lebih baik terhadap *Staphylococcus aureus*, sedangkan senyawa Turunan KOSamf memiliki bioaktivitas yang lebih baik terhadap *E. coli*. Hal ini mungkin disebabkan oleh senyawa 3,5-dikloroanilin yang dikopling terhadap kitosan memberikan efek yang lebih baik terhadap *E. coli*. Namun apabila dibandingkan dengan control positif, senyawa KOSamf dan turunannya masih memiliki aktivitas antibakteri sedang

KESIMPULAN

KOSamf dapat dipersiapkan dari kitosan dengan derajat polimerisasinya adalah 26. Dalam penelitian ini, KOSamf dapat dimodifikasi dengan memfungsionalisasi gugus aldehyd yang terdapat pada rantai ujung KOSamf melalui reaksi reduktif aminasi. Senyawa KOSamf memiliki aktivitas yang lebih baik terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, sedangkan Turunan KOSamf memiliki aktivitas yang lebih baik terhadap bakteri *E. coli*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R.M., Chiellini, E. Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications, *Prog. Polym.Sci.***36**, 981-1014 (2011).
2. Tommeraas, K., Varum, K.M., Christensen, B.E., Smidsrod, O. Preparation and characterization of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerization of chitosans, *Carbohydr. Res.***333**, 137-144 (2001)
3. Aam, B.B., Heggset, E.B., Norberg, A.L., Sorlie, M., Varum, K.M., Eijsink, V.G.M. Production of chitooligosaccharides and their potential application in medicine: A review. *Mar. Drugs.* **8**, 1482-1517 (2010)
4. Mourya, V.K., Inamdar, N.N., Choudhari, Y.M. Chitooligosaccharides: Synthesis, characterization and applications, *Polym.Sci., Ser.A* **53.53**, 583-612 (2011)
5. Alba, M., Marmuse, L., Delolme, F., Vors, J.P., Ladavière, C., Trombotto, S. Access to tetra-N-acetylchitopentaose by chemical N-acetylation of glucosamine pentamer, *Carbohydr.Polym.***98**, 770-777 (2013)
6. Cabrera, J.C., Cutsem, P.V. Preparation of chitooligosaccharides with degree of polymerization higher than 6 by acid or enzymatic degradation of chitosan, *Biochem. Eng. J.* **25**, 165-172 (2005)
7. Xia, W., Lui, P., Zhang, J., Chen, J. Biological activities of chitosan and chitooligosaccharide, *Food Hydrocolloids* **.25**, 170-179 (2011)
8. Salim, E., Galais, A., Trombotto, S. 4-(Hexyloxy)aniline-linked chitooligosaccharide-2,5-anhydro-D-mannofuranose, *Molbank*, **M815**, 1-4 (2014)
9. Nurfadilah. *Uji Bioaktifitas Antibakteri Ekstrak Dan Fraksi Lamun Dari Kepulauan Spermonde*, Kota Makassar. Jurusan Ilmu Kelautan Fakultas Ilmu Kelautan Dan Perikanan Universitas Hasanuddin Makassar (2013)