

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang dan Permasalahan yang akan diteliti

Latar belakang dari penelitian yang akan dilakukan adalah keterbatasan dan mahalnya material penutup luka biologis yang dapat digunakan. Penutup luka biologis yang digunakan selama ini berasal dari kulit babi atau kulit jenazah manusia, namun kedua bahan tersebut hanya dapat digunakan untuk waktu yang singkat dan mahal. Menurut referensi literatur menunjukkan bahwa selulosa mikrobial menunjukkan kinerja cukup baik untuk dapat digunakan dalam penyembuhan luka, hidrofilisitas yang tinggi sehingga dapat digunakan sebagai pembuluh darah buatan, bersifat non-allergenik, dan dapat disterilisasi tanpa mempengaruhi karakteristik material tersebut (Hoenich, 2006 dan Ciechanska, 2004).

Hasil penelitian pendahulu sebelumnya menunjukkan bahwa limbah rumah tangga berupa air cucian beras, air rebusan singkong, air rebusan ubi jalar, air rebusan kulit pisang, dan limbah air kelapa masing-masing dapat dibuat nata melalui penambahan sukrosa, urea, dan asam asetat sebagai pemberi suasana. Nata yang dihasilkan ternyata merupakan polimer selulosa diperkuat oleh difraktogram XRD, spektrum IR, dan pengamatan permukaan dengan SEM (Heru Pratomo dan Eli Rohaeti, 2010). Mikroorganisme yang dapat menghasilkan selulosa tersebut adalah *Acetobacter*. *Acetobacter* merupakan bakteri yang digunakan untuk menghasilkan cuka. Seringkali ditemukan membran yang menyerupai gel berupa film pada permukaan media kultur ketika proses produksi cuka berlangsung. Setelah diidentifikasi material ini dikenal sebagai selulosa bakteri (Philips and Williams, 2000). Selulosa bakteri yang diperoleh ternyata dapat digunakan untuk merawat penderita gagal ginjal dan sebagai kulit pengganti sementara untuk merawat luka bakar. Selulosa juga dapat diimplantasikan ke dalam tubuh manusia dalam bentuk benang jahit yang digunakan dalam pembedahan (Hoenich, 2006). Selulosa bakteri memiliki struktur kimia sama seperti selulosa yang berasal dari

tumbuhan, namun selulosa bakteri memiliki keunggulan antara lain kemurnian tinggi, derajat kristalinitas tinggi, kekuatan tarik tinggi, elastis, dan terbiodegradasi.

Hasil penelitian pendahuluan berikutnya menunjukkan penguatan terhadap hasil penelitian pendahuluan tahun 2010 yaitu semua jenis rumah tangga (air kelapa, air rebusan kulit pisang, ubi jalar dan singkong) dapat digunakan sebagai media *Acetobacter xylinum* **dalam membentuk selulosa. Selain itu, penelitian** ini juga melaporkan metode perendaman memungkinkan penambahan kitosan lebih tinggi dibandingkan metode perebusan, penambahan kitosan dapat menurunkan kristalinitas dan ada sifat mekanik selulose bakteri yang dihasilkan. Penambahan pemlastis dapat menurunkan perpanjangan saat putus material selulosa bakteri yang dihasilkan. (Tutiek Rahayu & Eli Rohaeti, 2012).

Berdasarkan kedua penelitian pendahuluan diketahui bahwa pembuatan selulose bakteri dengan medium air kelapa paling mudah dilakukan memerlukan waktu paling singkat dan didukung kemudahan untuk mendapatkan bahan dasar berupa air kelapa. Indonesia merupakan penghasil kelapa (*Cocos nucifera*) nomor 3 di dunia.

Pemanfaatan limbah rumah tangga air sebagai media untuk pembentukan selulosa bakteri untuk keperluan medis khususnya sebagai material penutup luka belum banyak diteliti. Dengan demikian perlu dilakukan penelitian tentang pemanfaatan limbah rumah tangga air sebagai media dalam pembentukan selulosa bakteri. Untuk memperoleh material penutup luka lebih berkualitas maka akan dilakukan penambahan kitosan ke dalam media kultur pembentukan selulosa dan dilakukan variasi agitasi karena hasilnya lebih homogen sehingga bila dipakai sebagai penutup luka akan memberikan penyembuhan yang lebih optimal.

Kitosan dalam bentuk larutan dan gel, dapat digunakan sebagai bakteriostatik, fungistatik, dan bahan untuk pelapis. Serat kitosan telah digunakan sebagai benang jahit dalam pembedahan yang dapat diserap oleh tubuh manusia, sebagai perban penutup luka, dan sebagai carrier obat-obatan.

Kitosan juga mempengaruhi proses pembekuan darah sehingga dapat digunakan sebagai haemostatik.

Adanya sifat-sifat unggul dari selulosa bakteri dan kitosan maka dapat dibuat suatu bahan komposit yang mengalami interaksi antara bagian molekul kitosan (unit glukosamin dan N-asetilglukosamin) dengan rantai selulosa yang dihasilkan. Untuk memperbaiki keelastisan dari material selulosa tersebut dapat dilakukan penambahan pemlastis pada saat pembentukan selulosa bakteri tanpa dan dengan modifikasi dan dilakukan variasi agitasi.

B. Tujuan dari penelitian yang akan dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui pengaruh pemberian gliserol dosis rendah yaitu 0,5% terhadap sifat material selulose bakteri yang ditambah kitosan 2%?
2. Bagaimana pengaruh penambahan kitosan 2% dengan pelastis gliserol kadar 0,5% terhadap aktivitas antibakteri selulose berbasis limbah rumah tangga?
3. Bagaimanakah pengaruh penambahan kitosan 2 % pada selulose bakteri dengan pemlastis terhadap penyembuhan luka pada kulit tikus galur wistar jantan?

C. Temuan/inovasi yang Ditargetkan Serta Penerapannya dalam Rangka Menunjang Pembangunan dan Pengembangan IPTEKS-SOSBUD.

Inovasi dari penelitian ini adalah penghasilan selulose bakteri yang bersifat unggul pada uji komabilitas dan uji bakteri sehingga dapat diharapkan dapat diaplikasikan sebagai penutup luka pengganti penutup luka sintesis dan penutup luka biologis yang mahal harganya. Pembuatan selulose bakteri tersebut dengan variasi agitasi sehingga didapatkan selulosa bakteri yang lebih homogen sehingga menyembuhkan luka lebih optimal.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

Pembuatan selulosa bakteri yang telah dilakukan oleh Aton Yulianto, dkk., (2000) dengan mensintesis selulosa bakteri melalui metode tradisional menggunakan *Acetobacter xylinum* dalam media statis merupakan *State of the art*. Selanjutnya dianalisis morfologi dan sifat fisik selulosa bakteri yang dihasilkan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa gel selulosa bakteri memiliki jaringan tiga dimensi yang terbentuk melalui ikatan hidrogen interfibrilar, morfologi gel bagian atas, dalam, dan bawah berbeda dalam hal ukuran dan kerapatan dari mikrofibril. Lebar mikrofibril berkisar 20 – 500 nm dengan urutan bagian atas > bawah > dalam, sedangkan urutan kerapatan mikrofibril adalah bagian atas > dalam > bawah. Film selulosa bakteri yang sudah dikeringkan memiliki sifat mekanik cukup tinggi dengan nilai modulus Young 30 GPa. Bakri Rosidi dkk (2000) telah berhasil memproduksi selulosa bakteri dari limbah buah-buahan berupa kulit nanas, tomat, dan pisang. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa amonium hidrofosfat paling efektif dibandingkan dengan amonium sulfat dan urea digunakan sebagai sumber senyawa nitrogen dalam pembuatan selulosa bakteri. Priyo Waspodo, dkk., (2000) telah menghasilkan mempreparasi selulosa bakteri dengan starter *Acetobacter xylinum* yang kering. Hasil penelitian menunjukkan bahwa starter *Acetobacter xylinum* kering dapat dibuat dari dekstrin pati jagung, atau pati jagung pragelatinisasi sebagai material pengikat yang dikeringkan dalam oven selama 24 jam pada 40 dan 50 °C. Penggunaan starter kering dapat menghasilkan 57% b/v selulosa bakteri.

Bakteri *Acetobacter xylinum* adalah bakteri yang dapat mensintesis selulosa dari fruktosa. Ciri-ciri *Acetobacter xylinum* yaitu berbentuk batang, tidak bergerak, gram negatif, mampu membentuk asam dari glukosa etil, propil alkohol dan glikol, mampu melakukan reaksi katalisis, tidak mereduksi nitrat, dapat mengoksidasi asam asetat menjadi CO₂ dan air. *Acetobacter xylinum* dapat menghasilkan lapisan selulosa yang tebal pada permukaan cairan media.

Pembuatan selulosa bakteri atau nata merupakan sintesis polisakarida oleh bakteri *Acetobacter xylinum* dari gula sederhana baik dalam bentuk sukrosa, glukosa dan maltosa. Sintesis selulosa ini, pada dasarnya sama dengan sintesa pati dari glukosa. Jadi sukrosa yang ada pada medium limbah rumah tangga seperti air rebusan singkong, air rebusan ubi jalar, air cucian beras, dan air kelapa oleh bakteri *Acetobacter xylinum* dikonversi ke dalam bentuk glukosa dan fruktosa dengan adanya enzim sukrase. Reaksi peruraian sukrosa dapat dilihat pada Gambar 1. Berdasarkan reaksi pada Gambar 1 dapat dilihat bahwa sukrosa dikonversi dalam bentuk glukosa dan fruktosa. Glukosa dan fruktosa merupakan senyawa yang mudah digunakan oleh mikroorganisme (bakteri) karena mempunyai bentuk lebih sederhana dibandingkan dengan sukrosa.

Selulosa bakteri memiliki karakteristik mirip dengan kulit manusia, sehingga dapat digunakan sebagai pengganti kulit untuk merawat luka bakar yang serius (Ciechanska, 2004). Polandia telah mengembangkan suatu bahan komposit selulosa bakteri yang telah diproduksi untuk keperluan medis. Modifikasi tersebut dilakukan dengan menambahkan polisakarida bioaktif seperti kitosan ke dalam media kultur pembentukan selulosa. Bahan komposit tersebut dapat digunakan untuk pengobatan luka yang sukar sembuh, luka bernanah, dan luka-luka yang memerlukan penggantian pembalut berulang kali (Ciechanska, 2004).

Kitosan merupakan senyawa turunan dari kitin yang memiliki struktur (1,4)-2-amino-2-deoksi- β -D-glukosa. Sumber kitosan yang sangat potensial adalah kerangka *Crustaceae* (Muzzarell, 1997). Kitosan telah diproduksi secara komersial melalui destilasi alkalin molekul kitin yang diperoleh dari *crustaceae* (Phillips and Williams, 2000).

Kitosan diperoleh melalui modifikasi kitin dengan cara penambahan basa pada kitin sehingga terjadi deasetilasi, gugus asetamida akan terhidrolisis menghasilkan asam amino bebas dan terbentuklah kitosan. Hidrolisis dapat dilakukan dengan penambahan NaOH 40%, apabila derajat deasetilasi di atas 60% atau di bawah 40% maka produk kitosan yang diperoleh tidak dapat larut dalam air (Muzzarelli. dkk., 1986). Penambahan asam dilakukan untuk menghilangkan mineral sehingga kandungan abu dalam kitosan kurang dari 0,1%. Perlakuan

tersebut juga memungkinkan penghilangan protein yang terikat dalam matriks kitin-mineral. Selanjutnya kitin ditambah dengan larutan basa pekat yang panas.

Kitosan memiliki reaktifitas kimia yang baik karena memiliki sejumlah gugus hidroksil (-OH) dan gugus amina (-NH₂) pada rantainya. Kitosan merupakan polimer hidrofilik yang tersusun oleh unit glukosamin dan N-asetilglukosamin bersifat tidak beracun, biokompatibel, dan dapat didegradasi secara biologis (Hosokawa et al., 1990). Kebanyakan polisakarida yang terdapat di alam bersifat netral dan asam seperti selulosa, dekstran, peptin, asam alginat, agar, dan carragenan, sedangkan kitin dan kitosan merupakan contoh polisakarida yang bersifat basa. Selulosa merupakan homopolimer, sedangkan kitin dan kitosan merupakan heteropolimer (Kumar, 2000).

Kitin dan kitosan menunjukkan aktivitas antibakteri, antimetastatik, antiurikemik, antiosteoporotik dan immunoadjuvant, menunjukkan potensi umum dalam penyakit alleviasi, mencegah penyakit atau memberikan kontribusi terhadap kesehatan cukup baik (Muzzarelli, 1996). Kitosan bersifat antimikroba terhadap berbagai organisme target. Aktivasnya sangat bervariasi tergantung pada jenis kitosan yang digunakan, organisme target, dan lingkungan ketika eksperimen dilakukan. Jamur dan kapang merupakan kelompok yang paling dipengaruhi, diikuti bakteri gram positif dan yang terakhir bakteri gram negatif (Rhoades dan Rastall, 1995).

Salah-satu keunggulan dari kitosan adalah ketahanannya terhadap enzim hidrolitik tertentu. Sewaktu terjadinya degradasi kitosan secara enzimatik, mono dan oligosakarida yang bioaktif pada molekul kitosan terlepas, yang menstimulasi terjadinya angiogenesis dan regenerasi jaringan (Ciechanska, 2004).

Setiap tubuh makhluk hidup mempunyai fungsi proteksi diri secara biologis terhadap infeksi penyakit. Perkembangan sel dan aktivitas lysozom ekstraseluler meningkat dalam kultur in vitro sel otot polos vascular tikus karena adanya oligosakarida kitosan. Luka pada jaringan dapat ditutup atau dirawat dengan menggunakan membran, lembaran spons, kapas, bubuk halus, larutan serta balsam yang terbuat dari kitin, kitosan atau senyawa turunannya. Aktivitas kitinase meningkat pada saat terjadinya luka, terjadi rangsangan terhadap

pertumbuhan jaringan dan penyembuhan luka dipercepat karena terhambatnya infeksi oleh mikroba. Beberapa penutup luka seperti kulit buatan telah diproduksi dari kitin dan kitosan, dan telah dijual sebagai penyembuh luka pada manusia maupun hewan (Goosen, 1997).

Selulosa bakteri dan kitosan masing-masing memiliki gugus hidroksil sehingga bahan pemlastis yang memiliki gugus fungsi fleksibel seperti gugus –OH dalam gliserol dan gugus –COOH dalam asam oleat diharapkan dapat berinteraksi dengan selulosa bakteri dan kitosan menghasilkan suatu material dengan sifat mekanik lebih fleksibel.

Gliserol (1,2,3-propanetriol) memiliki struktur kimia seperti ditunjukkan pada Gambar 6. Gliserol adalah senyawa netral dengan rasa manis dan tidak berwarna, berupa cairan kental dengan titik lebur 20°C dan memiliki titik didih yang tinggi yaitu 290°C. Gliserol dapat larut secara sempurna di dalam air dan alkohol, tetapi tidak larut dalam minyak. Sebaliknya banyak zat mudah larut dalam gliserol dibandingkan dalam air dan alkohol, oleh karena itu gliserol merupakan suatu pelarut yang baik.

Peran gliserol dalam pembuatan film selulosa bakteri yaitu sebagai pemlastis. Pemlastis didefinisikan sebagai bahan non volatil, bertitik didih tinggi yang ditambahkan pada material lain dapat merubah sifat fisik dari material tersebut. Dalam pembuatan film, pemlastis dipakai untuk memperbaiki profil film, menjaga keutuhan, dan menghindari lubang dan keretakan. Pemlastis dapat mengatur sifat mekanis film menjadi lebih bervariasi. Penambahan pemlastis dapat menghasilkan film lebih fleksibel, lebih kuat dan tidak mudah dipecah, namun juga mempengaruhi sifat barriernya.

Yusmarlela (2009) mengungkapkan bahwa diperoleh permukaan film yang lebih halus dan sedikit gumpalan pada fotografi permukaan spesimen pati dengan gliserol sebagai pemlastis yang diperbesar 200 kali. Hal ini disebabkan gliserol selain pemlastis juga membantu kelarutan pati (lebih *homogen*). Hal tersebut dimungkinkan gliserol yang dicampurkan telah berinteraksi dengan pati terutama terbentuknya ikatan hidrogen antara atom H dari OH gliserol dengan atom O dari OH selulosa.

Asam oleat merupakan asam lemak tidak jenuh yang banyak terkandung dalam minyak zaitun. Asam ini tersusun dari 18 atom C dengan satu ikatan rangkap di antara atom C ke-9 dan ke-10. Selain dalam minyak zaitun (55-80%), asam lemak ini juga terkandung dalam minyak bunga matahari kultivar tertentu, minyak raps, serta minyak biji anggur. Asam lemak ini pada suhu ruang berupa cairan kental dengan warna kuning pucat atau kuning kecoklatan. Asam ini memiliki aroma yang khas, tidak larut dalam air, titik lebur 15,3°C dan titik didih 360°C.

Asam oleat dapat dihasilkan dari fraksinasi asam lemak yang diperoleh dari proses pengubahan minyak menjadi asam lemak. Dalam hal ini proses yang digunakan adalah proses hidrolisis.

Penggunaan asam oleat sebagai pemlastis prinsipnya sama dengan pemlastis gliserol, yaitu adanya interaksi antara polimer dengan pemlastis yang dipengaruhi oleh afinitas kedua komponen. Interaksi asam oleat dengan selulosa dari nata adalah adanya ikatan hidrogen antar atom H dari -COOH asam oleat dengan atom O dari OH selulosa.

Penelitian pendahuluan yang telah kami lakukan antara lain pada **penelitian Unggulan UNY tahun 2010** yaitu membuat nata (selulosa bakteri) dari limbah rumah tangga yang diberi nama *nata de coco*, *nata de cassava*, *nata de ipomea*, *nata de oryza*, dan *nata de banana* yang masing-masing dihasilkan dari air kelapa, air perasan parutan singkong, air perasan parutan ubi jalar, air cucian beras, dan kulit perasan setelah mengalami pemeraman atau fermentasi selama 2-3 hari yang akan diaplikasikan sebagai material bioplastik.

Berbagai *nata* yang dihasilkan sebagai bahan dasar bioplastik pada umumnya bertekstur kenyal, licin, dan transparan. Ketebalan nata yang baik digunakan sebagai bahan dasar bioplastik adalah nata dengan umur pemeraman 2-3 hari, selebihnya nata yang terbentuk akan terlalu tebal dan sulit dikeringkan untuk dijadikan bioplastik. (Heru Pratomo dan Eli Rohaeti, 2010). Untuk itu perlu diperhatikan beberapa hal yang dapat mempengaruhi kualitas nata sebagai bahan dasar bioplastik antara lain : Keasaman larutan atau pH, tempat pemeraman, dan bahan tambahan. Selain itu, suhu dan agitasi juga mempengaruhi pertumbuhan

acetobacter sehingga pengaturannya juga diperlukan untuk peningkatan kualitas selulose bakteri..

Selanjutnya hasil uji sifat mekanik berupa uji tarik menggunakan alat *Universal Testing Machine* model UCT-5T dengan metode uji ISO 527-2 yang dilakukan pada suhu 23⁰C dengan kelembaban ruang uji 50% ditunjukkan oleh Tabel 1.

Tabel 1. Sifat mekanik film *nata de coco*, *nata de cassava*, dan *nata de oryza*

No	Sampel nata	<i>Tensile strength</i> (MPa)	<i>Break strength</i> (MPa)	<i>Break strain</i> (%)
1	<i>Nata de coco</i>	87,0	86,8	8,9
2	<i>Nata de cassava</i>	73,9	73,9	1,8
3	<i>Nata de oryza</i>	6,8	6,8	5,3

Nata de cassava memiliki modulus *Young* paling tinggi pada penelitian ini (Tabel 2). Dengan demikian film bioplastik dari *nata de cassava* menunjukkan kekakuan paling tinggi dibandingkan sampel film nata lainnya.

Tabel 2. *Modulus Young* film *nata de coco*, *nata de cassava*, dan *nata de oryza*

No	Sampel	Modulus Young (MPa)
1	<i>Nata de coco</i>	978
2	<i>Nata de cassava</i>	4106
3	<i>Nata de oryza</i>	128

Berdasarkan analisis sifat termal dengan alat *Differential Thermal Analysis* dan *Thermogravimetric Analysis* (DTA-TGA) menunjukkan bahwa film *nata de coco* menunjukkan puncak endoterm pada 323,66⁰C, sedangkan keempat film nata lainnya tidak menunjukkan puncak endoterm. Kesemua film nata menunjukkan puncak eksoterm pada 59,1 – 65,47⁰C. Puncak eksoterm yang muncul merupakan temperatur kristalisasi, terjadi pada saat transisi dari satu fasa kristalin ke fasa kristalin lainnya. Kesemua film nata yang dihasilkan mengalami transisi dari fasa kristalin α ke β . Film *nata de oryza* menunjukkan temperatur kristalisasi terjadi pada temperatur lebih tinggi dibandingkan dengan film nata lainnya. Hal tersebut diperkuat oleh difraktogram XRD *nata de oryza* menunjukkan intensitas suatu daerah kristalin (sekitar 40⁰) sangat tajam.

Hasil uji biodegradasi menunjukkan bahwa semakin bertambahnya waktu biodegradasi, persen pengurangan massa film nata semakin meningkat pula. Film nata mengalami biodegradasi sempurna pada hari ke-20, film nata hancur dan tidak dapat diambil karena menyatu dengan medium malaka. Dengan demikian terbukti bahwa film bioplastik dari nata ternyata mudah mengalami biodegradasi.

Selanjutnya pada **penelitian pendahuluan kami dengan bantuan dana dari Bappeda tahun 2011** menunjukkan bahwa penambahan asam oleat 1,5% dan gliserol 2% dalam pembuatan bioplastik *nata de coco* menghasilkan bioplastik lebih elastis namun tidak mempengaruhi kualitas gugus fungsi dalam bioplastik yang dihasilkan. Penambahan pemlastis dengan komposisi asam oleat 1,5 % (v/v) serta gliserol 2% (v/v) akan meningkatkan nilai *tensile strength* dan nilai *strain* bioplastik dari air kelapa. Bioplastik mempunyai kualitas lebih baik dalam hal menahan beban dan lebih fleksibel daripada bioplastik dari *nata de coco* tanpa penambahan pemlastis. Penambahan pemlastis berupa asam oleat dan gliserol akan meningkatkan pengurangan massa dan laju pengurangan massa bioplastik pada saat proses biodegradasi. Adanya tambahan pemlastis tersebut, menyebabkan mikroorganisme pengurai dapat menghidrolisis atau menguraikan bahan bioplastik tersebut menjadi molekul lebih sederhana dan menjadi nutrisi bagi mikroorganisme.

Luka dan penyembuhannya

Luka ialah hilang atau rusaknya sebagian jaringan tubuh atau rusaknya kesatuan/komponen jaringan, dimana secara spesifik terdapat substansi jaringan yang rusak atau hilang. Ketika luka timbul, beberapa efek akan muncul diantaranya hilangnya seluruh atau sebagian fungsi organ, respon stres simpatis, perdarahan dan pembekuan darah, kontaminasi bakteri dan kematian sel (Kaplan & Hentz, 1992 dalam Grace Riani Pongsipulung, Paulina V. Y. Yamlean, Yos Banne)

Luka sering digambarkan berdasarkan bagaimana cara mendapatkan luka itu dan menunjukkan derajat luka (Taylor, 1997).

1. Berdasarkan tingkat kontaminasi
 - a. Clean Wounds (Luka bersih), yaitu luka bedah takterinfeksi yang mana tidak terjadi proses peradangan (inflamasi) dan infeksi pada sistem pernafasan, pencernaan, genital dan urinari tidak terjadi. Luka bersih biasanya menghasilkan luka yang tertutup; jika diperlukan dimasukkan drainase tertutup (misal; Jackson – Pratt). Kemungkinan terjadinya infeksi luka sekitar 1% - 5%.
 - b. Clean-contaminated Wounds (Luka bersih terkontaminasi), merupakan luka pembedahan dimana saluran respirasi, pencernaan, genital atau perkemihan dalam kondisi terkontrol, kontaminasi tidak selalu terjadi, kemungkinan timbulnya infeksi luka adalah 3% - 11%.
 - c. Contaminated Wounds (Luka terkontaminasi), termasuk luka terbuka, fresh, luka akibat kecelakaan dan operasi dengan kerusakan besar dengan teknik aseptik atau kontaminasi dari saluran cerna; pada kategori ini juga termasuk insisi akut, inflamasi nonpurulen. Kemungkinan infeksi luka 10% - 17%.
 - d. Dirty or Infected Wounds (Luka kotor atau infeksi), yaitu terdapatnya mikroorganisme pada luka
2. Berdasarkan kedalaman dan luasnya luka
 - a. Stadium I : Luka Superfisial (“Non-Blanching Erythema) : yaitu luka yang terjadi pada lapisan epidermis kulit.

- b. Stadium II : Luka “Partial Thickness” : yaitu hilangnya lapisan kulit pada lapisan epidermis dan bagian atas dari dermis. Merupakan luka superficial dan adanya tanda klinis seperti abrasi, blister atau lubang yang dangkal.
 - c. Stadium III : Luka “Full Thickness” : yaitu hilangnya kulit keseluruhan meliputi kerusakan atau nekrosis jaringan subkutan yang dapat meluas sampai bawah tetapi tidak melewati jaringan yang mendasarinya. Lukanya sampai pada lapisan epidermis, dermis dan fascia tetapi tidak mengenai otot. Luka timbul secara klinis sebagai suatu lubang yang dalam dengan atau tanpa merusak jaringan sekitarnya.
 - d. Stadium IV : Luka “Full Thickness” yang telah mencapai lapisan otot, tendon dan tulang dengan adanya destruksi/kerusakan yang luas.
3. Berdasarkan waktu penyembuhan luka
- a. Luka akut : yaitu luka dengan masa penyembuhan sesuai dengan konsep penyembuhan yang telah disepakati.
 - b. Luka kronis yaitu luka yang mengalami kegagalan dalam proses penyembuhan, dapat karena faktor eksogen dan endogen.

Tubuh yang sehat mempunyai kemampuan alami untuk melindungi dan memulihkan dirinya. Peningkatan aliran darah ke daerah yang rusak, membersihkan sel dan benda asing dan perkembangan awal seluler bagian dari proses penyembuhan. Proses penyembuhan terjadi secara normal tanpa bantuan, walaupun beberapa bahan perawatan dapat membantu untuk mendukung proses penyembuhan. Sebagai contoh, melindungi area yang luka bebas dari kotoran dengan menjaga kebersihan membantu untuk meningkatkan penyembuhan jaringan (Taylor, 1997).

Proses penyembuhan luka merupakan proses biologis yang dinamis dengan tujuan akhir pemulihan fungsi dan integritas jaringan serta meliputi berbagai mekanisme yang kompleks yaitu, proses pembekuan darah, proses inflamasi, proliferasi sel, koagulasi, fibroplasia, epitelisasi, kontraksi, pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis), dan rekonstruksi matriks ekstrasel atau *repair and remodeling*. Interaksi faktor-faktor pertumbuhan dan sel epitel

fibroblas dan sel endotel berperan penting dalam proses biologis penyembuhan luka. Penilaian proses penyembuhan luka dapat juga dilakukan dengan pengukuran luas permukaan, kedalaman, volume dan tampilan klinis seperti granulasi dan eksudat luka. (Fuad Ama, Achmad Arifin, Djoko Legowo).

Ada beberapa prinsip dalam penyembuhan luka menurut Taylor (1997) yaitu:

1. Kemampuan tubuh untuk menangani trauma jaringan dipengaruhi oleh luasnya kerusakan dan keadaan umum kesehatan tiap orang.
2. Respon tubuh pada luka lebih efektif jika nutrisi yang tepat tetap dijaga
3. Respon tubuh secara sistemik pada trauma
4. Aliran darah ke dan dari jaringan yang luka
5. Keutuhan kulit dan mukosa membran disiapkan sebagai garis pertama untuk mempertahankan diri dari mikroorganisme, dan
6. Penyembuhan normal ditingkatkan ketika luka bebas dari benda asing tubuh termasuk bakteri.

Secara garis besar proses penyembuhan luka dibagi tiga fase: fase inflamasi, fase proliferasi dan fase maturasi (*fase epithelisasi dan remodelling*). Umumnya proses penyembuhan luka normal dibagi dalam tiga tahap. Fase biologis penyembuhan luka [Robert F, 2004 dalam Fuad Ama, Achmad Arifin, Djoko Legowo]:

1. Fase inflamasi

Yaitu tahap peradangan luka, bengkak dan nyeri berwarna merah. Segera setelah timbulnya luka terjadi *vasokonstriksi* lokal yang menghentikan pendarahan dan darah dalam luka membeku. Setelah 5-10 menit tahap inflamasi akut mulai terjadi kemudian sesudah itu lekosit dalam waktu 2-3 hari jelas terlihat pada luka dan menunjukkan mulai proses penyembuhan. Pada fase inflamasi terjadi respons vaskuler dan seluler yang terjadi akibat luka pada jaringan lunak. Tujuan yang hendak dicapai adalah menghentikan pendarahan dan membersihkan area luka dari benda asing, sel-sel mati dan bakteri untuk mempersiapkan dimulainya proses penyembuhan. Pada awal

phase ini, kerusakan pembuluh darah akan menyebabkan keluarnya platelet yang berfungsi dalam proses hemostasis (pembekuan darah).

2. Fase proliferasi

Yaitu tahap pertumbuhan sel-sel jaringan di tempat luka. Pada luka ada krusta sebagai hasil serum yang mengering berwarna kuning-hitam. Setelah 2 hari tahap inflammasi, kolagen dikeluarkan dan dimulai proses ikatan dan proses ke arah penggabungan yang kuat antara tepi luka. Dalam waktu 4-6 hari, jaringan granulasi sehat berwarna merah muda membentuk dasar untuk menyokong dan memberi makan epitelium yang meluas. *Angiogenesis* suatu proses pembentukan pembuluh kapiler baru didalam luka, mempunyai arti penting pada tahap proliferasi proses penyembuhan luka. Pada fase ini fibroplasia dan *angiogenesis* merupakan proses terintegrasi dan dipengaruhi oleh substansi yang dikeluarkan oleh platelet dan makrofag (*growth factors*).

3. Fase epithelisasi dan *remodeling* (*Penyudahan*)

Yaitu tahap pertumbuhan jaringan kulit (epitel) dan perbaikan menuju seperti kulit semula. Krusta lepas dan sudah tumbuh jaringan epitel untuk menjadi seperti kulit semula. Kontraksi luka adalah proses penyempitan luka yang disebabkan oleh *miofibroblast* yang terdapat di seluruh tubuh terutama terpusat di sekitar luka. Pada luka kulit akan sembuh dengan baik dalam waktu 2 sampai 3 minggu, luka fasia abdomen akan rapat dalam waktu 6 minggu tetapi tetap terus berkembang semakin erat selama 6 bulan, tendo atau ligamentum membutuhkan waktu sekurang-kurangnya 3 bulan dan berakhir sampai kurang lebih 12 bulan.

BAB III

METODE PENELITIAN

Tahap penelitian yang akan dilakukan pada **tahun pertama** adalah sebagai berikut:

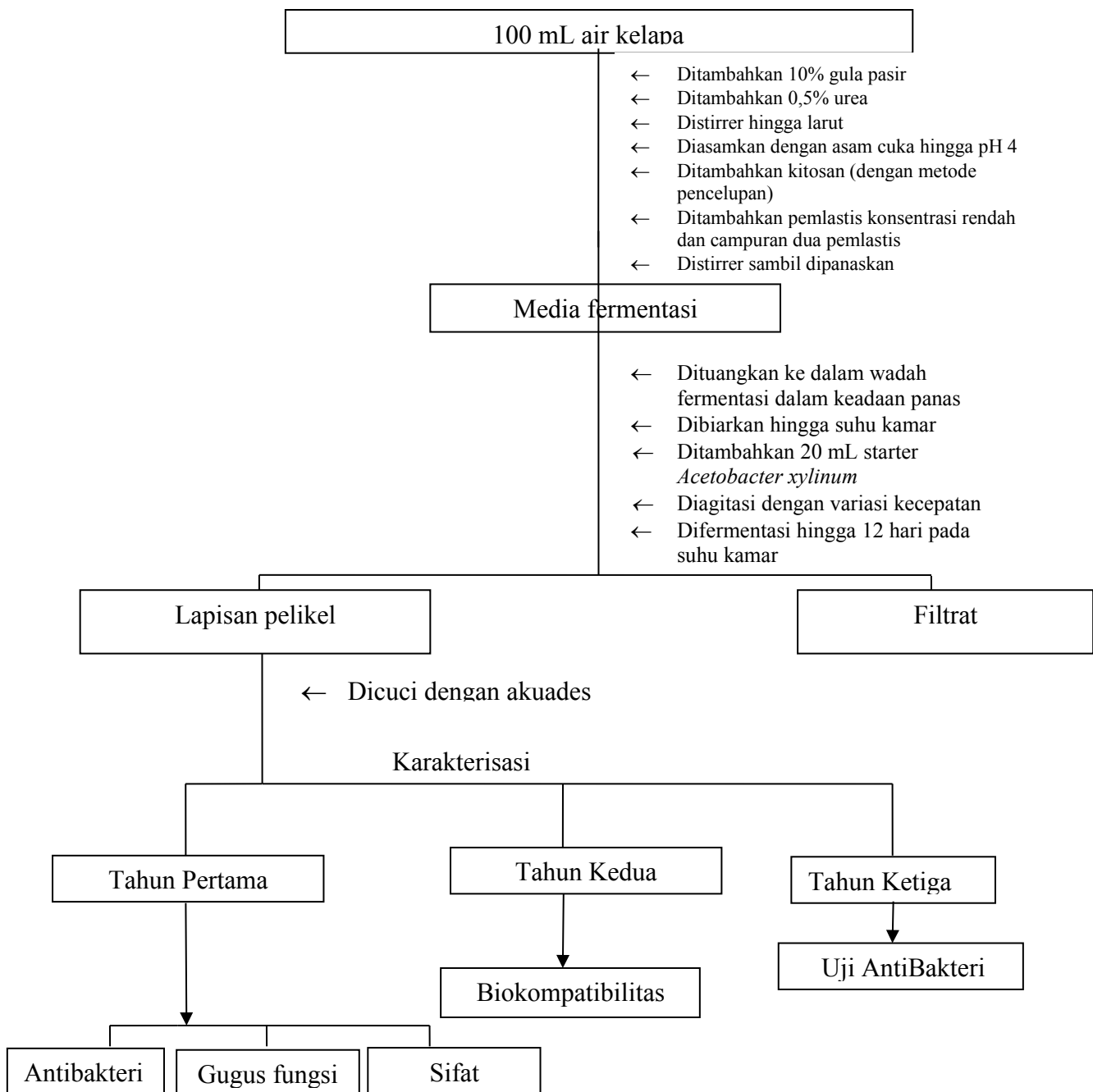
1. Preparasi selulosa bakteri dari air limbah tangga dengan penambahan atau tanpa kitosan 2% dan dengan penambahan atau tanpa pemlastis gliserol konsentrasi 0,5%.
2. Karakterisasi selulosa bakteri – kitosan dengan penambahan pemlastis meliputi analisis sifat termal, sifat mekanik, dan gugus fungsi.
3. **Uji Biokompatibilitas** selulosa-kitosan dengan menggunakan hewan uji.
 - a. Pengelompokkan hewan uji yaitu kelompok perlakuan 1 hari, 3 hari, 5 hari, 7 hari
 - b. Pembuatan luka pada hewan uji yang sebelumnya dicukur bulunya
 - c. Pembuatan kontrol, dan perlakuan. Pada Hewan uji sebagai kontrol, luka hewan uji diberi perlakuan dengan menutupnya menggunakan kasa steril dengan leukoplast. Hewan uji perlakuan, luka ditutup dengan selulosa, selulosa dengan kitosan dan selulosa dengan pemaltis dan kitosan.
 - d. Hewan dibuka penutupnya dan diukur panjang luka yang masih ada dengan jangka sorong dan dicatat menurut kelompoknya
 - e. Hewan uji dikorbankan dan diambil bagian kulitnya
 - f. Bagian kulit yang diambil dibuat preparat histologi
 - g. Pemberian skor. Berdasarkan pengamatan histologi kulit, selanjutnya dilakukan skoring untuk melihat keefektifan dari lama pemberian selulosa bakteri – kitosan tanpa dan dengan penambahan pemlastis pada luka hewan uji
4. Uji Aktivitas Antibakteri
 - a. Pembuatan suspensi bakteri uji. Isolat murni *3 bakteri gram negatif dan 3 bakteri gram positif* penyebab infeksi luka pada kulit ditambahkan ke dalam media BHI broth yang diinkubasi pada 37⁰C selama kurang lebih 4

jam sampai kekeruhan Brain Heart Infusion broth (BHI broth) menyamai kekeruhannya McFarland no. 1 (Christoforus, 2010)

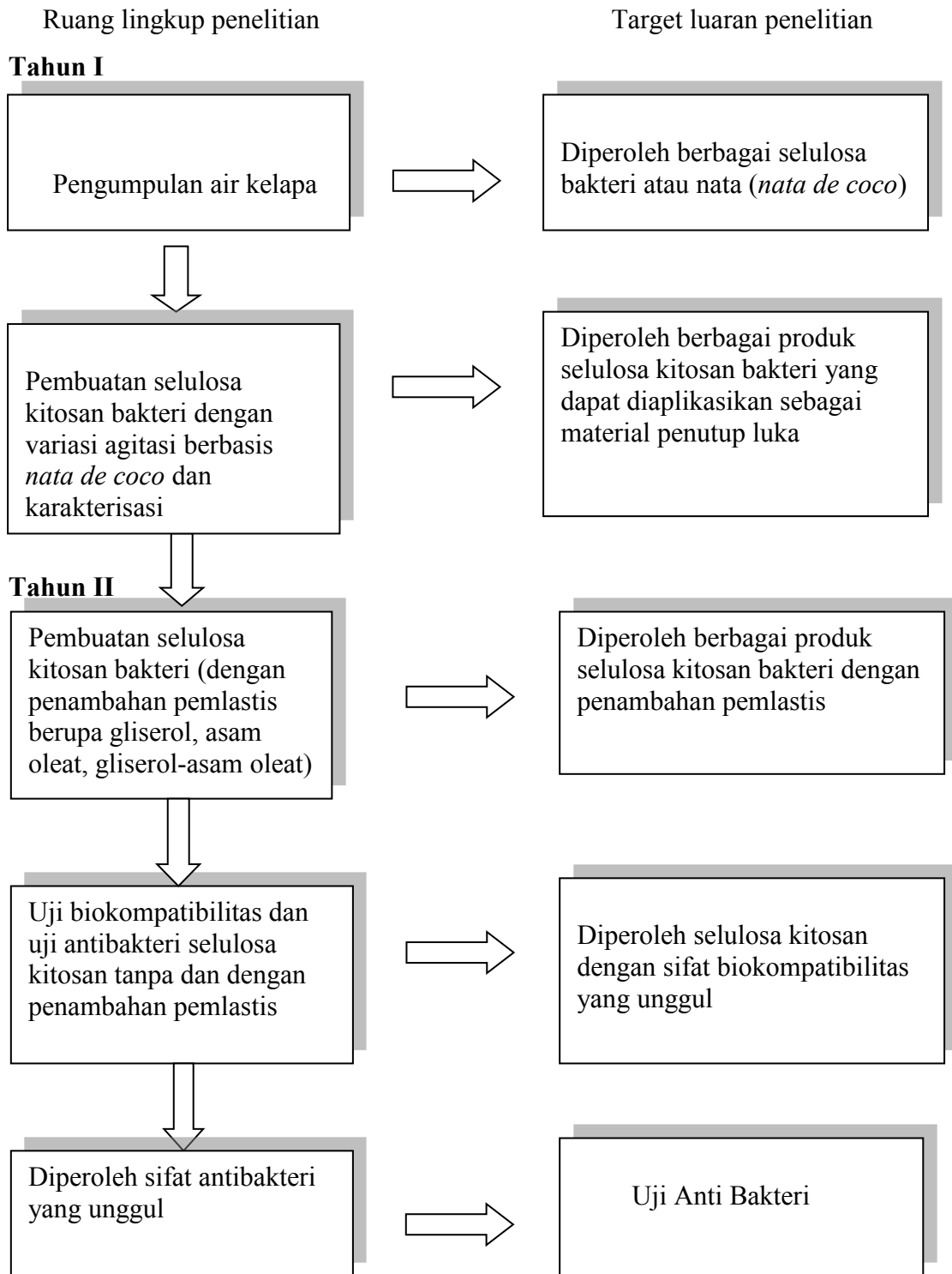
- b. Pembuatan media. Media yang digunakan untuk uji aktivitas antimikroba adalah MHA. Larutan MHA dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak 20 mL dan dibiarkan beberapa saat hingga memadat (Christoforus, 2010)
- c. Penanaman bakteri uji. Hasil suspensi bakteri uji sebanyak 0,2 mL dimasukkan ke dalam media MHA dengan cara doleskan secara merata dengan menggunakan *spreader*, lalu didiamkan kurang lebih selama 5 menit (Christoforus, 2010)
- d. Pemberian kontrol positif pada bakteri uji. Sebagai kontrol positif digunakan antibiotik kloramfenikol. Sebanyak 20 μ L larutan kontrol positif (kloramfenikol 20 μ g) diteteskan pada paper disk. Bakteri uji yang sudah ditanamkan pada Mueller-Hinton Agar kemudian diberi paper disk berisi kloramfenikol tadi sebanyak 4 disk per plate. Kemudian diinkubasikan pada 37°C selama 24 jam (Ardhuha F, Harapan, 2010)
- e. Pemberian kontrol negatif pada bakteri uji. Sebagai control negative digunakan asam asetat. Sebanyak 20 μ L asam asetat diteteskan pada paper disk. Bakteri uji yang sudah ditanamkan pada Mueller-Hinton Agar kemudian diberi paper disk berisi asam asetat tadi sebanyak 4 disk per plate. Kemudian diinkubasikan pada 37°C selama 24 jam.
- f. Pemberian selulosa dan selulosa-kitosan, serta selulosa-kitosan-pemlastis pada bakteri uji. Bakteri uji yang sudah ditanamkan pada Mueller-Hinton Agar kemudian diberi potongan biomaterial (selulosa, selulosa-kitosan, selulosa-kitosan-pemlastis) yang sudah disterilisasi sebelumnya. Biomaterial ini dipotong serupa dengan bentuk dan ukuran paper disk yang bertindak sebagai kontrol positif dan kontrol negatif tadi. Diletakkan sebanyak 4 potongan biomaterial per plate. Kemudian diinkubasikan pada 37°C selama 24 jam. Hal yang sama juga dilakukan untuk membrane kitosan dan selulosa bakteri.

- g. Pengukuran zona hambat. Pengukuran zona hambat dilakukan dengan mengukur diameter zona hambat dalam millimeter, kemudian dihitung persentase kekuatan aktivitas daya hambat.

Metode penelitian diperlihatkan pada Gambar 1. Bagan alir (Gambar 1) menunjukkan ruang lingkup komponen penelitian serta target luaran penelitian. Sintesis Selulosa Kitosan Bakteri dengan Penambahan Pemplastis



Gambar 2. Metode Penelitian



Gambar 2. Sistematika peneliti

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Analisis Karakteristik Membran

1. Ketela Rambut

a. Analisis Sifat Fisik Secara Makroskopis

Tujuan analisis ini untuk mengetahui sifat fisik dari masing-masing membran yang dihasilkan, baik itu membran kitosan, membran selulosa bakteri dan membran selulosa+gliserol+kitosan. Hasil dari analisis ini tersajikan dalam Tabel 3.

Tabel 3. Hasil pengamatan *sifat fisik membran*

<i>No</i>	<i>Sifat Fisik</i>	<i>Selulosa Bakteri</i>	<i>Kitosan</i>	<i>Selulosa+kitosan+gliserol</i>
1	Warna	Kuning kecoklatan	Kuning	Kuning kecoklatan
2	Tekstur	Kasar	Halus	Halus
3	Bentuk	Lembaran seperti kertas	Lembaran seperti kertas	Lembaran seperti kertas
4	Transparansi	Tidak	Transparan	Tidak

Berdasarkan hasil pengamatan ini ternyata penambahan kitosan dan gliserol membuat tekstur dari membran yang terbentuk menjadi lebih halus dibandingkan dengan membran selulosa. Hal ini dikarenakan adanya penambahan kitosan akan mengisi rongga-rongga dari selulosa bakteri, sehingga permukaannya menjadi lebih halus. Adanya perubahan tekstur juga dimungkinkan adanya interaksi antara selulosa bakteri dengan kitosan (Chawla *et al.* 2009). Pengamatan terhadap sifat fisik selulosa bakteri yang dilakukan tersebut ternyata

memiliki kemiripan dengan pengamatan sifat fisik selulosa bakteri yang dilakukan oleh Pratomo dan Rohaeti (2011).

Adanya rongga-rongga pada selulosa bakteri sebagai akibat pembentukan mikrofibril yang tidak merata menyebabkan tekstur yang kasar. Hal ini terjadi pada saat fermentasi oleh bakteri *Acetobacter xylinum*. Rongga-rongga ini akan terlihat jika dilakukan analisis morfologi permukaan dengan SEM.

2. Air Cucian Beras

a. Analisis Sifat Fisik Secara Makroskopis dan Organoleptis

Analisis secara makroskopis dan organoleptis ini bertujuan untuk melihat sifat fisik dan perbedaan karakteristik masing-masing biomaterial. Berikut Tabel 4, merupakan hasil sifat fisik sampel biomaterial

Tabel 4. Hasil Sifat Fisik Sampel Biomaterial

No	Sifat Fisik	Selulosa Bakteri	Selulosa Bakteri+Kitosan	Kitosan
1	Warna	Putih	Kuning Kecoklatan	Kuning tua kecoklatan
2	Tekstur	Halus	Kasar	Halus
3	Konsistensi	Elastis	Elastis	Kurang elastis
4	Transparasi	Tidak	Tidak	Tidak
5	Bau	Khas Selulosa	Khas selulosa dan kitosan	Khas kitosan

Ketiga biomaterial bersifat tidak transparan, konsistensi ketiganya elastis hanya pada membran kitosan seelastis membran selulosa bakteri ataupun membran selulosa bakteri+kitosan merupakan hasil pengamatan fisik tersebut . Hal ini terjadi karena pada membrane

kitosan tidak diberi bakteri+kitosan. Hal ini terjadi karena pada membrane kitosan tidak diberi tambahan gliserol, dimana peranan gliserol ini adalah sebagai *plasticizer*. Bau antara selulosa dan kitosan pun dapat dibedakan karena masing-masing memiliki bau yang khas.

Penambahan kitosan mengakibatkan perbedaan warna dan tekstur pada membrane. Perbedaan warna ini diakibatkan oleh kitosan sendiri yang memiliki warna kuning kecoklatan ketika dilarutkan didalam asam asetat. Adapun tekstur pada biomaterial selulosa bakteri+kitosan ini memiliki permukaan yang sedikit kasar karena penyebaran kitosan yang kurang merata pada permukaan lapisan pelikel. Perubahan tekstur dari biomaterial selulosa bakteri akibat penambahan kitosan ini juga dapat menyebabkan kemungkinan adanya interaksi antara selulosa bakteri dengan kitosan. Interaksi tersebut dapat diamati dari profil spectra IR-nya. Penggunaan SEM untuk melihat penempelan kitosan pada rongga-rongga di biomaterial selulosa bakteri dapat diamati jelas.

3. Ketela Pohon

a. Analisis sifat fisik secara makroskopis.

Tabel 5. Hasil Pengamatan Sifat Fisik Membran

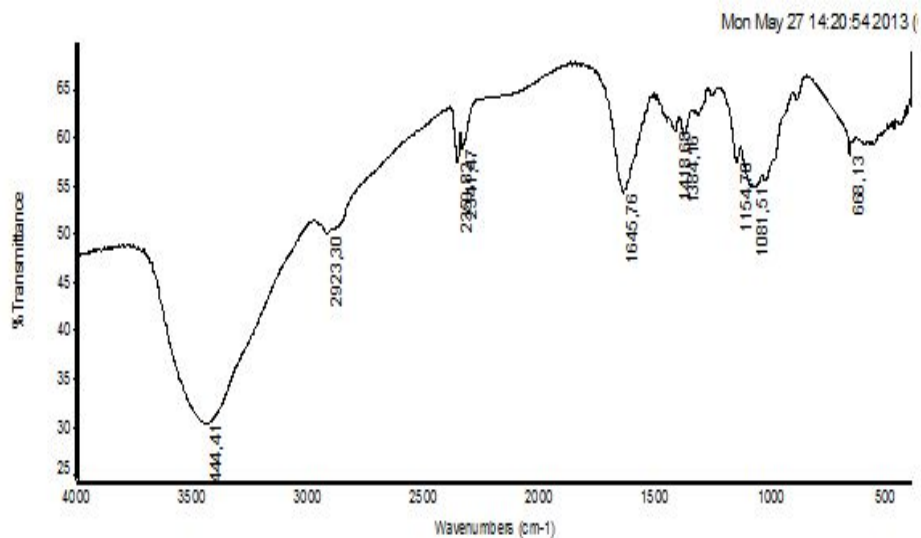
No	Sifat Fisik	Selulosa Bakteri	Kitosan	Selulosa+kitosan +gliserol
1	Warna	Kuning kecoklatan	Kuning	Kuning kecoklatan
2	Tekstur	Kasar	Halus	Halus
3	Bentuk	Lembaran tipis	Lembaran seperti kertas	Lembaran seperti kertas
4	Transparansi	Tidak	Transparan	Tidak

Analisis ini bertujuan untuk mengetahui sifat fisik dari masing-masing membran yang dihasilkan, baik itu membran kitosan, membran selulosa bakteri dan membran selulosa+gliserol+kitosan. Hasil dari analisis ini tersajikan dalam Tabel 5.

B. Analisis Gugus Fungsi dengan Instrumen FT-IR

1. Ketela Rambut

Mengetahui gugus fungsi dari membran yang terbentuk (selulosa bakteri, kitosan, dan selulosa+kitosan+gliserol), serta mengetahui interaksi antara kitosan dengan selulosa bakteri. Berikut ini akan disajikan hasil spektra IR dari serbuk kitosan, selulosa bakteri, dan selulosa + gliserol + kitosan merupakan tujuan analisis ini



Gambar 3. Spektra IR serbuk kitosan

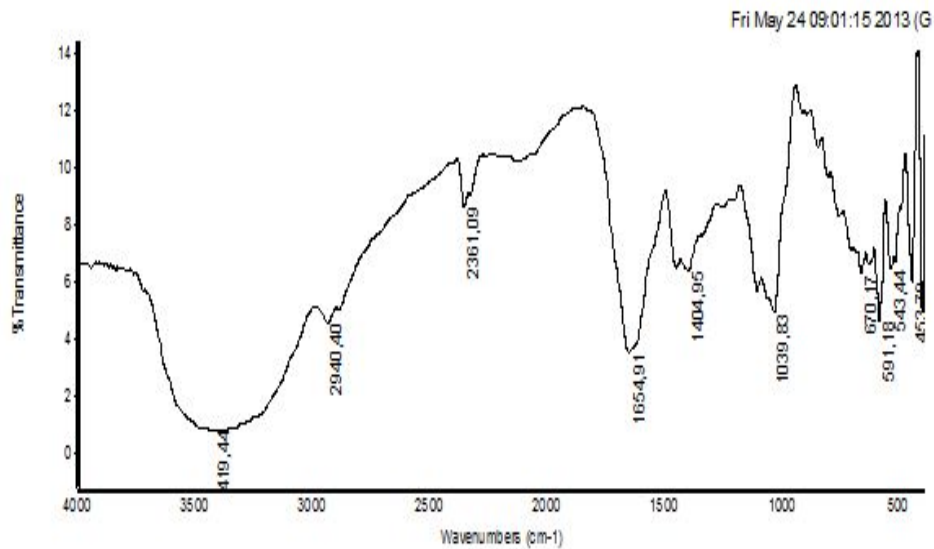
Pelaksanaan pemeriksaan gugus fungsi kitosan disebabkan hampir seluruh proses penelitian menggunakan kitosan. Berdasarkan spektra IR kitosan dapat dihitung nilai derajat deasetilasinya (DD). Pemeriksaan tersebut juga dapat digunakan sebagai pembanding bila dibandingkan spektranya dengan membran selulosa atau membran selulosa + kitosan + gliserol. Pembandingan spektra IR bertujuan untuk melihat jika ada interaksi antara membran selulosa dengan kitosan

Menurut perhitungan dengan metode *baseline*, kitosan yang digunakan memiliki derajat deasetilasi (DD) sebesar 74,94 %. Hal tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan Pillai, Paul dan Sharma (2009) yang menyatakan bahwa kitosan merupakan hasil deasetilasi kitin dengan derajat deasetilasi 60-90%. Selain itu berdasarkan Knurr (1982) menyebutkan bahwa syarat kitosan komersil adalah nilai derajat deasetilasi >70%. Hal ini membuktikan bahwa kitosan yang dijual dan digunakan memenuhi syarat secara komersil.

Menurut (Gambar 3) spectra IR ditemukan adanya serapan pita pada daerah 3444,41 cm^{-1} yang menunjukkan *stretching* NH dan *stretching* OH, dan pada daerah bilangan gelombang 1645,76 cm^{-1} yang menunjukkan serapan karbonil (C=O) khas amida dari N-Asetil glukosamin. Keadaan ini sesuai dengan penelitian Khan *et al.* (2002) yang menyatakan bahwa kitosan memiliki ciri pita serapan pada bilangan gelombang 1655 cm^{-1} dan bilangan gelombang 3450 cm^{-1} .

Keadaan tersebut mempunyai kemiripan dengan Anicuta *et al.*, (2010) yang melaporkan adanya karakteristik kitosan pada daerah 1559,17 cm^{-1} (*stretching* gugus amino) dan daerah 3367,1 cm^{-1} yang menunjukkan vibrasi NH simetrik. Berdasarkan spektrum tersebut maka dapat disimpulkan bahwa serbuk yang digunakan merupakan kitosan.

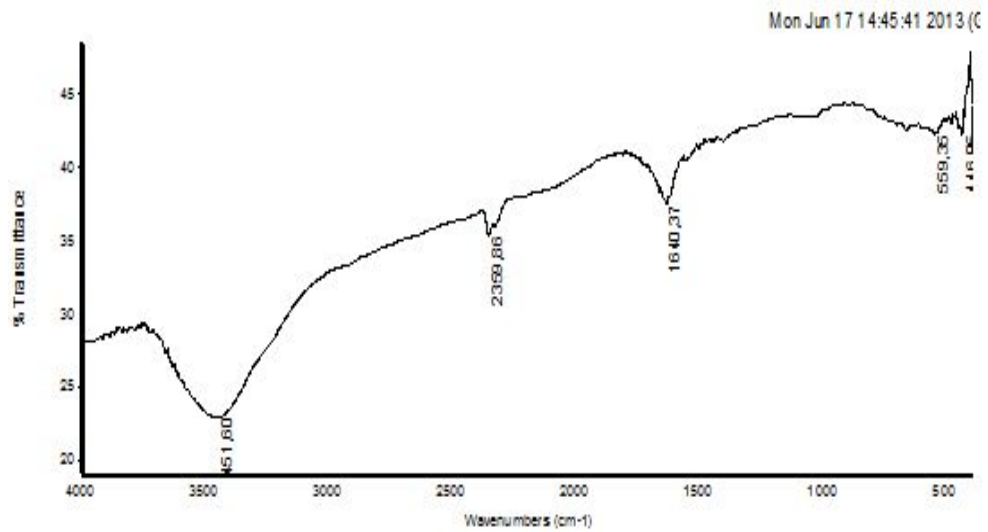
Gambar 4, menunjukkan pita serapan selulosa bakteri. Pita serapan pada bilangan gelombang 3419,44 cm^{-1} yang merupakan OH *stretching*, pada gelombang 2940,40 cm^{-1} yang menunjukkan serapan CH alifatik/ -CH *stretching*, pada bilangan gelombang 1654,91 cm^{-1} yang menunjukkan serapan C=O *stretching* pada ujung terminal dari selulosa bakteri, pada bilangan gelombang 1404,95 cm^{-1} yang menunjukkan serapan CH *bending vibration*, serta pada bilangan gelombang 1039,83 cm^{-1} yang menunjukkan serapan β -1,4-glikosidik.



Gambar 4. Spektra IR selulosa bakteri

Keadaan ini hampir sama dengan penelitian Anicuta, *et al.*, (2010), pita absorpsi karakteristik selulosa muncul pada daerah bilangan gelombang 3350 cm^{-1} (*stretching* OH) dan $2916,81\text{ cm}^{-1}$ (*stretching* CH). Menurut penelitian Stefanescu *et al* (2011) menyatakan bahwa serapan selulosa ada pada bilangan gelombang 3430 cm^{-1} , 2919 cm^{-1} , 1659 cm^{-1} , 1422 cm^{-1} , 1374 cm^{-1} , 1158 cm^{-1} , 1067 cm^{-1} . Berdasarkan penelitian sebelumnya, dapat dipastikan bahwa selulosa bakteri yang digunakan memiliki kemiripan dengan selulosa bakteri pada umumnya.

Gambar 5, menunjukkan pita serapan pada bilangan gelombang $3451,60\text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan serapan khas kitosan yaitu serapan gugus hidroksil dari unit β -glukosa, gugus $-\text{NH}_2$ dari glukosamin dan $-\text{NH}-$ amida dari N-Asetil glukosamin yang saling bertumpang tindih.



Gambar 5. Spektra IR selulosa+kitosan+gliserol

Pita serapan lainnya yaitu pada bilangan gelombang $2359,86 \text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan serapan C-H *stretching*, pada bilangan gelombang $1640,37 \text{ cm}^{-1}$ yang merupakan serapan karbonil khas amida dari N-Asetil glukosamin. Bilangan gelombang $1640,37 \text{ cm}^{-1}$ ini menunjukkan karakteristik kitosan yaitu adanya ikatan HN-COCH_3 yang merupakan serapan amida kitosan yang berasal dari kitin yang belum terdeasetilasi. Jika dilihat dari penelitian yang dilakukan oleh Stefanescu *et al.* (2012) yang menyatakan bahwa telah ditemukan pita baru di sekitar daerah 1640 cm^{-1} atau 1643 cm^{-1} dan di sekitar daerah 1565 cm^{-1} yang menunjukkan adanya C=O *stretching* (Amida I) dan -NH bending (Amida II), namun pada hasil penelitian tidak terbaca *peak* pada daerah bilangan gelombang 1500 cm^{-1} , hal ini diperkirakan intensitasnya kurang kuat sehingga tertutupi oleh *peak* pada bilangan gelombang $1640,37 \text{ cm}^{-1}$

Tabel 6. Hasil interpretasi gugus fungsi membran

No	Membran	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Gugus Fungsi
1	Selulosa	3419,44	-OH
		2940,40	-CH alifatik
		1654,91	C=O <i>stretching</i>
		1404,95	-CH <i>bending vibration</i>
		1039,83	β-1,4-glikosidik
2	Kitosan	3444,41	-NH dan -OH
		2923,30	-CH <i>stretching</i>
		1645,76	C=O <i>stretching</i> (Amida I)
		1384,16	C-H <i>vibration</i>
		1154,70	Struktur sakarida
		1081,51	Vibrasi <i>stretching</i> C-O
3	SGK	3451,60	Serapan -NH
		2359,86	-CH <i>stretching</i>
		1640,37	HN-COCH ₃

Gambar 17 menjelaskan bahwa penambahan kitosan ini akan menyebabkan terjadinya penajaman dari puncak gugus -OH dari selulosa bakteri di sekitar bilangan gelombang 3400 cm⁻¹. Adanya puncak ini menunjukkan kemungkinan terjadinya overlapping antara gugus -OH dengan gugus -NH₂. Hal ini sesuai dengan penelitian yang diungkapkan oleh Anicuta *et. al.* (2010) yang menemukan adanya pergeseran pita yang semula di sekitar 3350,71 cm⁻¹ bergeser menjadi 3349,75 cm⁻¹ dan menjadi semakin lebar yang mengindikasikan adanya overlapping antara interaksi hidrogen dari gugus -OH dengan -NH₂. Berdasarkan hasil spektrum ini menunjukkan bahwa terjadi interaksi hidrogen antara selulosa bakteri

(gugus –OH) dengan kitosan (gugus –NH₂). Spektra IR yang dihasilkan dapat diinterpretasikan melalui Tabel 6.

Menurut hasil perhitungan intensitas *peak* dari masing-masing sampel dapat dilihat adanya perubahan intensitas gugus ketika dilakukan penambahan kitosan. Hasil perhitungan absorbansi tiap sampel ditunjukkan pada Tabel 7.

Tabel 7. Hasil absorbansi selulosa dan selulosa+kitosan+gliserol

No	Sampel	Gugus fungsi	Absorbansi
1	Selulosa	-OH	0.889
		C=O	0.488
2	Selulosa+kitosan +gliserol	-OH	0.106
		C=O	0.028

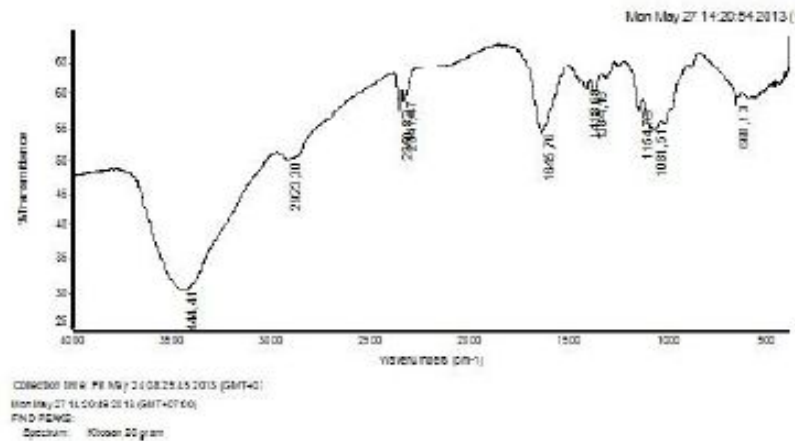
Menurut hasil perhitungan absorbansi, terlihat bahwa terjadi penurunan absorbansi baik itu pada gugus fungsi –OH maupun pada gugus fungsi karbonil (C=O). Adanya penurunan absorbansi dikarenakan adanya interaksi antara gugus hidroksil dari selulosa bakteri dengan gugus -NH₂ dari kitosan, sehingga mengurangi absorbansinya.

Hal tersebut dapat disebabkan adanya spektrum yang saling tumpang tindih. Berdasarkan literatur yang menyatakan bahwa pada daerah bilangan gelombang sekitar 3520-3200 cm⁻¹ menunjukkan serapan gugus hidroksil (-OH), pada daerah bilangan gelombang 3500-3300 cm⁻¹ menunjukkan serapan gugus amina (-RNH₂), pada daerah bilangan gelombang 3500-3100 cm⁻¹ menjelaskan serapan gugus –NH-amida. Ketiga gugus menunjukkan serapan pada daerah bilangan gelombang yang berdekatan, sehingga dapat terjadi tumpang tindih (Biemann, 1983).

2. Air Cucian Beras

Analisis FT-IR ini bertujuan untuk melihat adanya interaksi antara kitosan dengan selulosa bakteri yang ditunjukkan melalui spektra-spektra

yang menginterpretasikan gugus-gugus fungsi tiap biomaterial. Spektra FT-IR ini juga digunakan untuk melihat tingkat kemurnian kitosan yang digunakan melalui perhitungan DD (Derajat Deasetilasi). Hasil analisis spektra IR dari serbuk kitosan dapat dilihat pada gambar berikut:



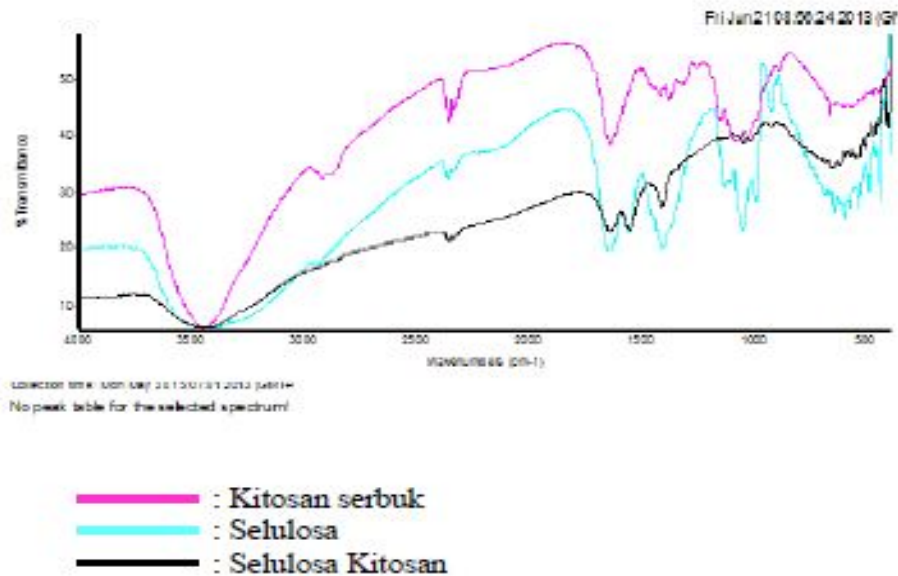
Gambar 6. Spektra IR serbuk kitosan

Analisis gugus fungsi terhadap serbuk kitosan ini dilaksanakan adalah karena serbuk ini digunakan dalam seluruh rangkaian penelitian. Selain itu, jika terdapat interaksi antara selulosa bakteri dengan kitosan, maka spektranya dapat dibandingkan dengan spektra dari selulosa bakteri sebab spektra dari serbuk kitosan ini digunakan sebagai kontrol pembanding antara selulosa bakteri dengan selulosa bakteri+kitosan. Spektra IR yang dihasilkan dalam penelitian ini akan dibandingkan dengan tabel korelasi (tabel 8) yang dinyatakan oleh Pearson, Marcheessault dan Liang (2003). Adanya tabel korelasi ini akan memudahkan peneliti dalam pembeccaan gugus-gugus fungsi pada masing-masing sampel.

Tabel 8. Tabel korelasi gugus serapan inframerah

Serapan cm^{-1}	Gugus	Referensi
3400	O-H	Pearson, Marcheessault dan Liang (2003)
2900	Asimetrik CH ₂	
2850	C-H stretching	
1650	Ikatan amida	
1550	Ikatan amida II	
1410	C-H bending	
1069	C-O stretching	
1029	C-O stretching	

Menurut Spektrum yang ditunjukkan pada gambar 6, dapat dilihat adanya pita khas kitosan yaitu pita lebar yang pada daerah 3444,42 cm^{-1} , 2923,30 cm^{-1} , 1418,66 cm^{-1} , 1081,52 cm^{-1} daerah 1645,76 cm^{-1} . Pita pada daerah 3444,41 cm^{-1} ini membuktikan adanya stretching O-H atau vibrasi NH₂, pada daerah 2923, 30 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus asimetrik CH₂, pada 1418,66 cm^{-1} menunjukkan adanya C-H bending. Pada 1081 cm^{-1} menunjukkan stretching C-O, sedangkan pita pada daerah 1645,76 cm^{-1} ini menjelaskan adanya ikatan amida pada kitosan. Pita serapan amida ternyata lebih tajam pada daerah 1650 cm^{-1} . Hal ini menunjukkan bahwa kitosan yang digunakan ternyata lebih banyak mengandung gugus fungsi kitin daripada kitosan. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Anicuta, et al., (2010) yang menyatakan adanya karakterisasi kitosan pada daerah 1559,17 cm^{-1} (stretching gugus amino_ dan pada daerah 3367,1 cm^{-1} yang menunjukkan adanya vibrasi NH simetrik. Berdasarkan data tersebut diatas dapat disimpulkan bahwa serbuk kitosan yang digunakan dalam penelitian ini benar merupakan kitosan. Berdasarkan perhitungan menggunakan metode *baseline*, dapat diketahui nilai DD (Derajat Deasetilasi_ serbuk kitosan yang digunakan, yaitu sebesar 74,94%.



Gambar 7. Overlay spectra IR

Pengaruh penambahan kitosan terhadap spectra IR dari selulosa bakteri ditunjukkan melalui Gambar 7. Berdasarkan gambar, dapat dilihat adanya perbedaan gugus-gugus fungsi dari masing-masing biomaterial. Perbedaan tersebut adalah karena serapan tiap biomaterial yang berbeda. Sehingga dihasilkan spectra khas yang menunjukkan gugus fungsi dari masing-masing sampel. Hasil interpretasi spectra IR masing-masing sampel ditunjukkan dalam Tabel 9.

Tabel 9. Hasil Spektra IR Biomaterial Selulosa dan Selulosa+Kitosan

No.	Sampel	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Gugus Fungsi
1	S	3433,6	-OH
		2364,56	-CH alifatik
		1646,65	C=O stretching (amida I)
		1414,26	-CH ₃ bending vibrations
		1055,17	β-1,4-glikosidik
2	SK	3446,14	-OH
		2360,78	-CH alifatik

		1647,61	C=O stretching (amida I)
		1557,77	-NH bending (amida II)
		1414,41	-CH ₃ bending vibrations

Stefanescu *et,al.*, (2012) mengatakan bahwa dalam penelitiannya telah ditemukan pita baru disekitas daerah 1565 cm⁻¹, 1640 cm⁻¹ atau 1643 cm⁻¹, dimana pada daerah tersebut menunjukkan adanya C=O stretching (Amida I) dan -NH bending (Amida II). Sesuai dengan Tabel IX, dapat dilihat adanya stretching C=O didaerah 1646,65 cm⁻¹ dan 1647,61 cm⁻¹ dan -NH bending (amida II) pada daerah 1557.77 cm⁻¹. Gugus tersebut merupakan ciri khas dari gugus C=O amida I dan gugus NH amida II pada kitosan, yang menunjukkan gugus amida dari kitin yang belum terdeasetilasi sempurna.

Tabel 10. Absorbansi biomaterial yang digunakan

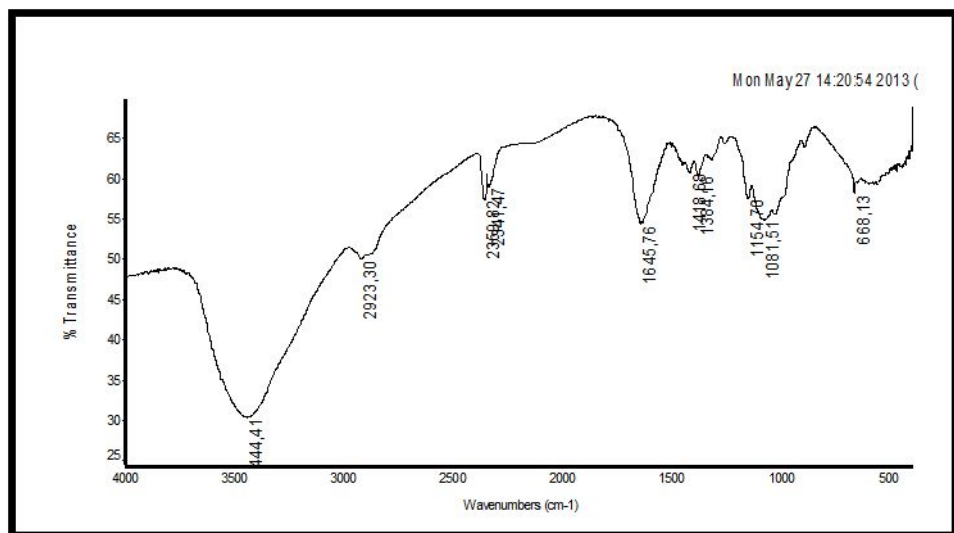
Sampel	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Absorbansi
SK	3446,14	0,2674
	1647,61	0,0505
S	3433,6	0,4935
	1646,65	0,2126
K	3444,41	0,6075
	1645,76	0,1431

Berdasarkan hasil spektra FT-IR ini dapat disimpulkan bahwa terjadi penurunan absorbansi antar selulosa+kitosan dengan selulosa pada daerah 3400 cm⁻¹. Keadaan ini menunjukkan terjadinya ikatan hydrogen antara kitosan dengan selulosa bakteri, sehingga serapan dari -OH bebas pada selulosa bakteri menurun karena karena lebih banyak yang terikat dengan gugus NH₂, dari kitosan. Sesuai dengan penelitian Demse (2008) yang menyatakan gugus NH₂ dari kitosan melalui ikatan kitosan dan dipol-

dipol berinteraksi dengan gugus –OH pada molekul kitosan bakteri yang dibuktikan melalui karakterisasi FT-IR, SEM dan uji Tarik. Kejadian pelebaran pita O-H dan –NH. Hal ini sesuai dengan yang diungkapkan Anicuta, *et.al.*, (2010) yang menyatakan bahwa ketika dilakukan pembuatan material komposit selulosa bakteri yang ditambah kitosan, akan terjadi pita stretching O-H dari 3350,71 cm^{-1} menjadi 3349,71 cm^{-1} dan juga terjadi pelebaran peak pada bilangan gelombang tersebut. Pada daerah 1600 terjadi penurunan absorbansi dari selulosa dengan selulosa setelah ditambah dengan kitosan. Adanya penurunan ini kemungkinan terjadi karena adanya interaksi antara gugus pereduksi selulosa yaitu C=O dengan NH_2 pada kitosan.

3. Ketela Pohon

Tujuan analisis ini adalah untuk melihat adanya interaksi antara gliserol dan kitosan dengan selulosa bakteri seiring dengan penambahan kedua bahan tersebut. Apabila ada interaksi maka akan terlihat adanya perbedaan dari spektra masing-masing biomaterial dan melalui spektra-spektra ini dapat diinterpretasikan gugus-gugus fungsi dari tiap-tiap biomaterial.

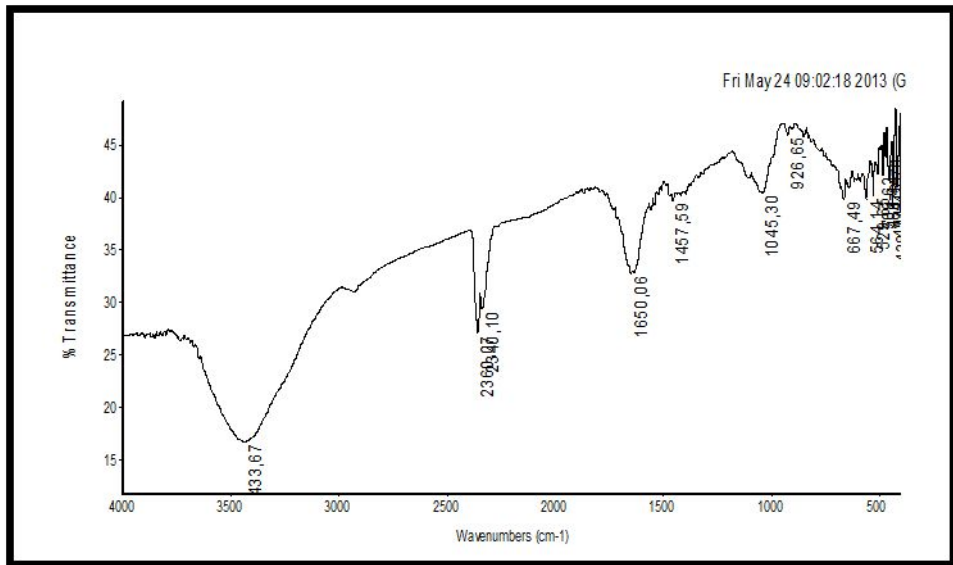


Gambar 8. Spektra IR kitosan

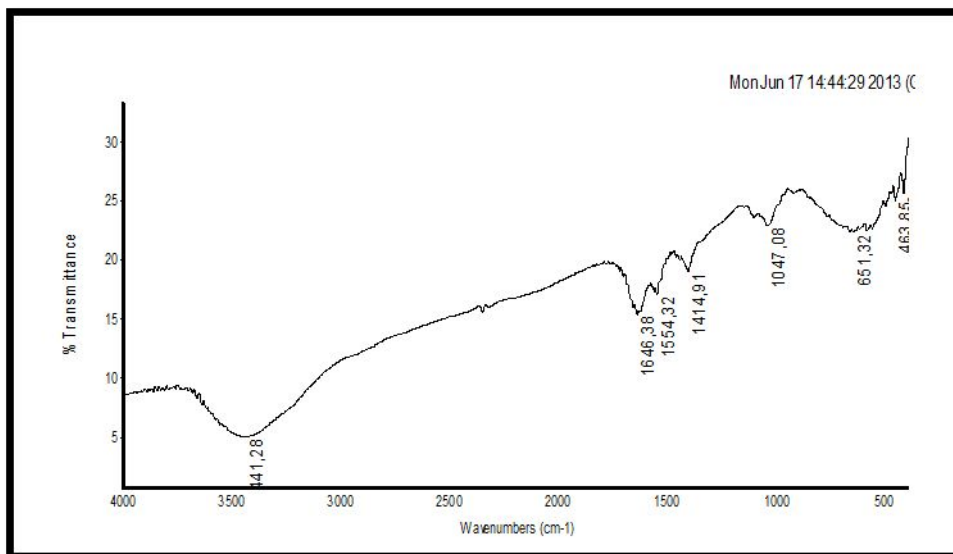
Analisis gugus fungsi dilaksanakan dengan instrumen FT – IR Shimadzu dengan membandingkan *peak* pada bilangan gelombang tertentu dan intensitasnya yang muncul dalam spektrum kitosan dan tiap kelompok sampel (SG/selulosa gliserol, SGK/selulosa gliserol kitosan). Proses *scanning* dilakukan pada bilangan gelombang 400 – 4000 cm^{-1} . Gugus fungsi kitosan perlu dianalisis, dikarenakan kitosan ini digunakan dalam seluruh rangkaian penelitian, sehingga nantinya dapat digunakan sebagai pembanding terhadap kelompok lainnya. Hasil analisis gugus fungsi dengan FT –IR didapatkan spektrum yang ditunjukkan oleh Gambar 8.

Menurut (Gambar 8) spektrum FT – IR ditemukan adanya pita khas kitosan yaitu pita lebar pada daerah $3444,41\text{cm}^{-1}$ yang menunjukkan *stretching* O-H/ vibrasi NH; dan pita pada daerah $1645,76\text{cm}^{-1}$ yang merupakan pita *stretching* gugus amida kitosan. Hal ini memiliki kemiripan dengan Anicuta, *et al.*, 2010 yang melaporkan adanya karakteristik kitosan pada daerah $1559,17\text{cm}^{-1}$ (*stretching* gugus amino) dan daerah $3367,1\text{cm}^{-1}$ yang menunjukkan vibrasi NH simetrik. Menurut spektrum tersebut maka dapat disimpulkan bahwa serbuk yang digunakan merupakan kitosan. Hasil penentuan derajat deasetilasi kitosan menunjukkan bahwa serbuk kitosan yang digunakan memiliki derajat deasetilasi 74,937%.

Anicuta, *et al.*, (2010) menyatakan pita absorpsi karakteristik selulosa muncul pada daerah bilangan gelombang 3350cm^{-1} (*stretching* OH) dan $2916,81\text{cm}^{-1}$ (*stretching* CH), hal ini sesuai dengan *peak* pada penelitian (Gambar 9) yaitu *peak* pada bilangan gelombang $3433,67$ (*stretching* OH) dan $2360,07$ (*stretching* CH) yang menunjukkan bahwa selulosa bakteri yang dibuat dengan proses fermentasi memiliki kemiripan struktur dengan selulosa. Pada spektra IR SG terdapat *peak* absorpsi pada daerah $1457,59\text{cm}^{-1}$ (kemungkinan *peaks* siklik piranosa aromatik) di samping pita absorpsi $1650,06\text{cm}^{-1}$ (C=O gugus ujung gula pereduksi dari selulosa).



Gambar 9. Spektra IR selulosa bakteri + gliserol (SG)



Gambar 10. Spektra IR selulosa bakteri+gliserol+kitosan (SGK)

Anicuta, *et al.*, (2010) menyatakan bahwa ketika dilakukan pembuatan material komposit dari selulosa bakteri yang diberi kitosan, akan terjadi pergeseran pita *stretching* O-H dari 3350,71 cm^{-1} menjadi 3349,72 cm^{-1} dan terjadi pelebaran *peak* pada bilangan gelombang tersebut. Hasil penelitian (Gambar 10) membuktikan adanya pergeseran pita

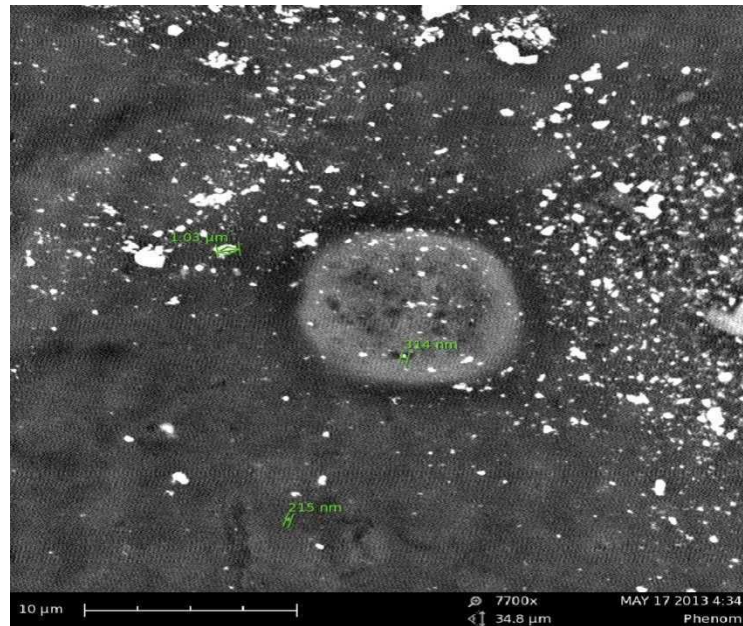
absorpsi menjadi $3441,28 \text{ cm}^{-1}$ dan muncul pita yang lebih lebar, yang kemungkinan terjadi karena adanya *overlapping stretching* ikatan O-H dan -NH. Gugus fungsi amida kitosan muncul pada daerah $1566,20 \text{ cm}^{-1}$ dengan intensitas kuat sesuai dengan yang telah dilaporkan Ciechanska, *et al.*, (2004), yaitu gugus amida I muncul pada 1650 cm^{-1} dan amida II pada 1560 cm^{-1} sebagai gugus amida karakteristik kitosan. Seperti pada spektrum SGK (Gambar 10), dapat terbaca *peak* pada daerah $1646,38 \text{ cm}^{-1}$ dan $1554,32 \text{ cm}^{-1}$. Dengan demikian, dapat ditunjukkan bahwa pada SGK diperoleh gugus fungsi amida karakteristik kitosan.

C. Analisis Struktur Morfologi

1. Ketela Rambut

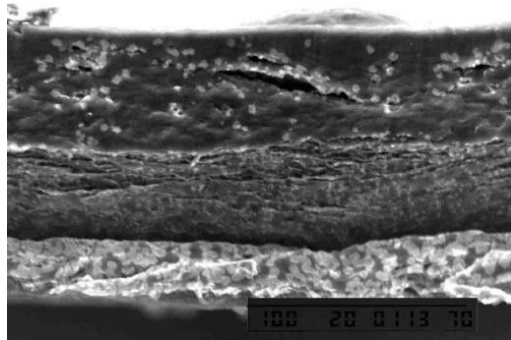
Tujuan analisis ini adalah untuk mengetahui bentuk dan perubahan permukaan dari suatu membran. Analisis ini menggunakan instrument SEM. Pada prinsipnya bila terjadi perubahan pada suatu membran, misalnya lekukan, patahan atau perubahan struktur dari permukaan, maka bahan tersebut cenderung mengalami perubahan energi. Energi itu dapat dipancarkan, diserap ataupun dipantulkan.

Mekanisme kerjanya adalah sampel tidak bermuatan ini diberi dobel tape karbon khusus lalu sampel dilapisi dengan partikel emas dengan alat *ion coating sputter*. Pelapisan dengan emas agar sampel ini memiliki muatan, dengan adanya muatan pada sampel ini, akan memantulkan elektron yang ditembakkan dari instrumen, elektron yang dipantulkan akan ditangkap dan dideteksi oleh instrumen lalu dihasilkan dalam bentuk gambar yang ditampilkan melalui monitor. Hasil foto permukaan dari selulosa bakteri yang diberi penambahan kitosan terlihat pada Gambar 11.



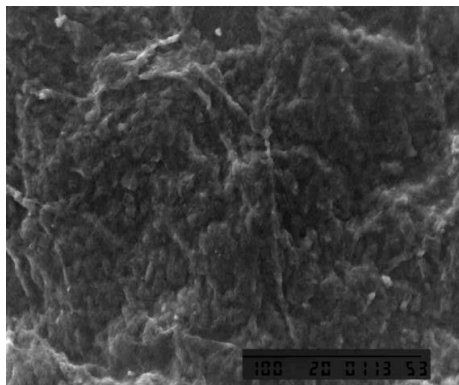
Gambar 11. Foto Permukaan SEM Selulosa+kitosan+gliserol

Gambar 11 membuktikan bahwa tekstur dari permukaan membran selulosa yang diberi penambahan kitosan memiliki tekstur yang halus. Hal ini dikarenakan partikel-partikel kitosan mengisi rongga-rongga kosong dari selulosa bakteri. Terlihat pula bahwa kitosan (berwarna putih) terdapat pada permukaan membran selulosa, hal ini membuktikan bahwa kitosan mampu melapisi membran selulosa bakteri. Berdasarkan gambar, ukuran partikel kitosan yang terlihat adalah 314 nm, 215 nm, dan 1,03 nm. Foto ini menggunakan perbesaran 7700x. Jika dilihat secara melintang, terlihat adanya tiga lapisan dari membran selulosa+kitosan+gliserol (Gambar 12). Lapisan yang ditengah merupakan lapisan selulosa bakteri dan lapisan diatas dan dibawahnya merupakan lapisan kitosan. Berdasarkan gambar dapat disimpulkan bahwa kitosan mampu melapisi membran selulosa bakteri dan berikatan dengan selulosa.



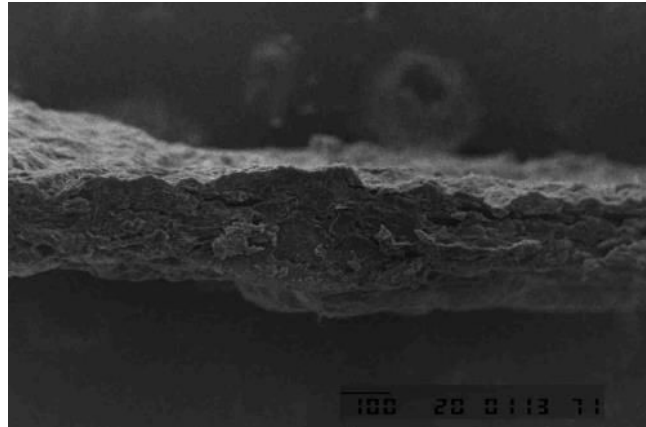
Gambar 12. Foto penampang melintang selulosa+kitosan+gliserol

Pada Gambar 13 menunjukkan adanya beberapa rongga serta bentuk yang tidak teratur. Hal ini menyebabkan tekstur dari membran selulosa menjadi lebih kasar.



Gambar 13. Foto permukaan membran selulosa

Jika dilihat secara melintang (Gambar 14) menunjukkan bahwa selulosa bakteri hanya terdiri dari satu lapisan saja dengan karakteristik yang sama, yaitu menyerupai mikrofibril-mikrofibril. Selain itu juga terlihat adanya rongga-rongga yang menunjukkan pembentukan mikrofibril yang tidak merata.



Gambar 14. Foto penampang melintang selulosa bakteri

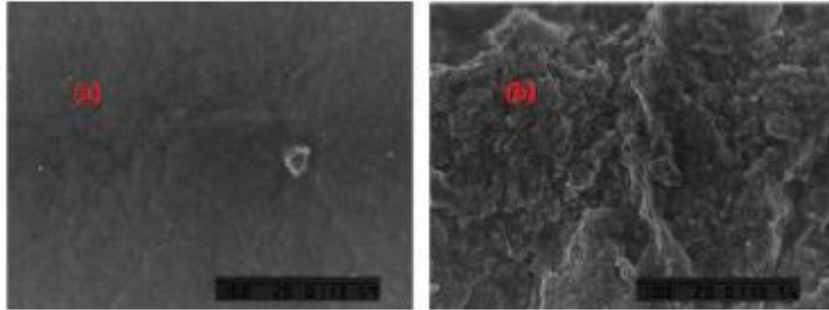
Menurut gambar-gambar yang sudah ditampilkan, dapat dibuktikan bahwa selulosa bakteri yang mendapat penambahan kitosan secara morfologi permukaan berbeda dengan morfologi selulosa bakteri itu sendiri. Hal ini sesuai dengan dugaan awal, bahwa kitosan dapat merubah morfologi permukaan dari selulosa bakteri dan dapat melapisi permukaan selulosa bakteri.

2. Air Cucian Beras

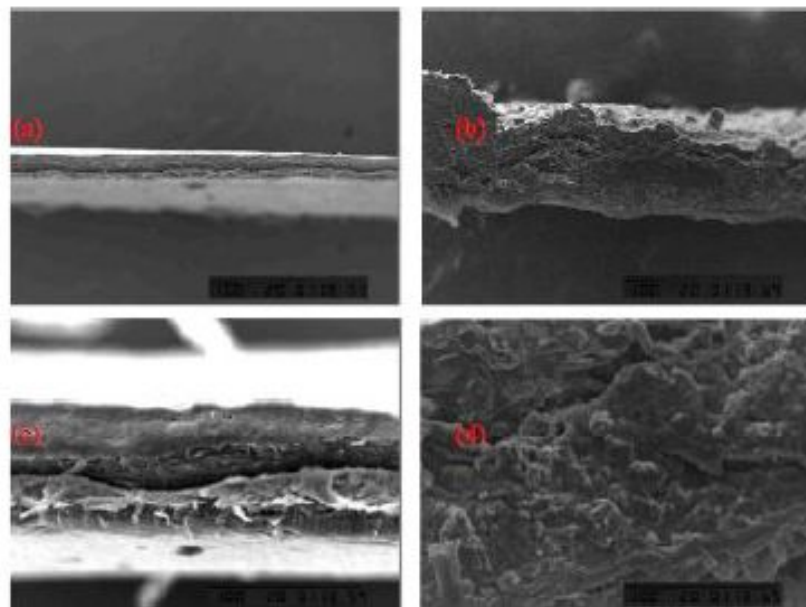
Analisis struktur ini bertujuan untuk melihat struktur morfologi dari selulosa bakteri yang telah dilapisi kitosan. Analisis ini dilakukan dengan menggunakan Scanning Electron Microscope (SEM). Sampel yang dianalisis hanyalah biomaterial selulosa dan biomaterial selulosa+kitosan, karena sesuai tujuan dari analisis ini yaitu untuk melihat apakah kitosan yang ditambahkan ke lapisan pelikel selulosa bakteri ini dapat bercampur dengan baik.

Sebelum dianalisis dengan instrument SEM, pertama-tama sampel akan dilapisi dengan emas melalui alat *gold ion sputter*. Pelapisan ini dilaksanakan dengan tujuan sampel agar memiliki muatan yang dapat memantulkan electron yang ditembakkan oleh instrument SEM nantinya. Elektron yang dipantulkan tersebut akan ditangkap dan dideteksi oleh instrumen, lalu diinterpretasikan dalam bentuk foto yang ditampilkan

melalui monitor. Hasil scanning biomaterial selulosa dan selulosa kitosan dapat dilihat pada Gambar 15 dan 16



Gambar 15a. membuktikan bahwa pada permukaan biomaterial selulosa yang ditambahkan kitosan terlihat lebih halus daripada biomaterial selulosa yang tidak dilapisi kitosan (Gambar 15b)



Gambar 16. Permukaan melintang selulosa bakteri (a). Dengan penambahan kitosan pada pengamatan perbesaran 100x (b). Tanpa penambahan kitosan pada pengamatan perbesaran 100x (c). Penambahan kitosan pengamatan perbesaran 500x (d). Tanpa penambahan kitosan pada pengamatan perbesaran 500x.

Pengamatan permukaan melintang pada Gambar 16 juga terdapat perbedaan yang nyata antara biomaterial yang ditambahkan kitosan dengan yang tidak ditambahkan kitosan. Pada biomaterial yang tidak ditambahkan kitosan (Gambar 16b dan 16d) terlihat ada serat-serat yang tidak beraturan, sedangkan pada biomaterial selulosa yang ditambahkan kitosan terlihat ada tiga lapisan yang berbeda, lapisan tersebut kemungkinan adalah peranan dari kitosan yang telah ditambahkan

Hasil *scanning* ini sedikit berbeda dengan hasil *scanning* pada penelitian penelitian yang dilakukan, salah satunya adalah penelitian Goh, et.al, (2010). Gambar selulosa bakteri yang dihasilkan memperlihatkan struktur dari selulosa bakteri berupa fibril-fibril. Adanya perbedaan ini kemungkinan besar adalah karena penggunaan alat SEM yang berbeda. Penelitian yang dilakukan oleh Goh, digunakan perbesaran 5000x, sedangkan alat SEM yang digunakan pada penelitian ini perbesaran 2000x sudah menunjukkan gambar yang tidak jelas sehingga struktur fibril selulosa tidak terlihat

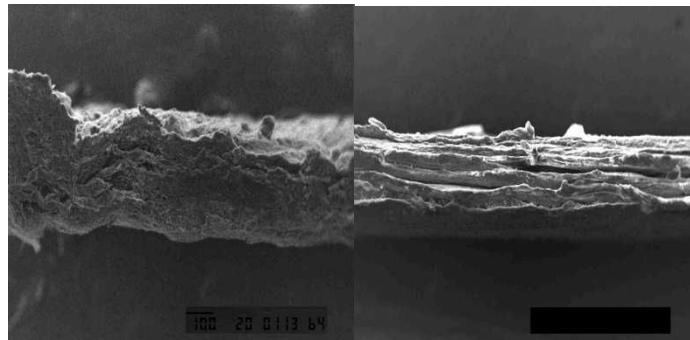
Hasil *scanning* ini sudah cukup menunjukkan bahwa kitosan yang ditambahkan mampu melapisi seluruh permukaan biomaterial selulosa bakteri, dan terlihat jelas perbedaan antara biomaterial selulosa yang ditambahkan kitosan dengan yang tidak ditambahkan kitosan

3. Ketela Pohon

Tujuan analisis ini untuk melihat struktur morfologi dari selulosa bakteri serta selulosa bakteri yang dilapisi kitosan. Analisis ini dilakukan dengan menggunakan instrumen SEM. Sampel yang semula tidak bermuatan ini diberi dobel tape karbon khusus setelah itu sampel dilapisi dengan partikel emas dengan alat *ion coating sputter*. Sampel harus dilapisi dengan emas agar sampel ini memiliki muatan, adanya muatan pada sampel ini akan memantulkan elektron yang ditembakkan dari instrumen, adanya elektron yang dipantulkan akan ditangkap dan dideteksi

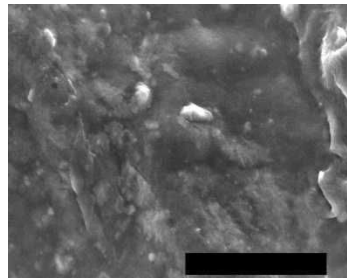
Tleh instrumen lalu dihasilkan dalam bentuk gambar yang ditampilkan melalui monitor.

Struktur permukaan dan melintang dari selulosa bakteri, bentuk mikrofibril dari selulosa bakteri, diameter dari mikrofibril selulosa bakteri maupun struktur permukaan serta melintang dari selulosa bakteri yang telah dilapisi dengan kitosan dapat diamati dengan analisis struktur morfologi ini.

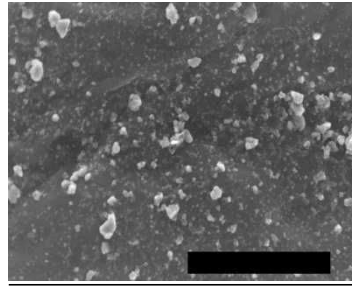


Gambar 17. Penampang *cross section* sampel S dan SGK perbesaran 100x

Pada penampang *cross section* sampel Selulosa (S) dan Selulosa bakteri gliserol kitosan (SGK) pada perbesaran 100x menunjukkan perbedaan (Gambar 17). Pengamatan menunjukkan ketebalan yang berbeda antara sampel (S) dan sampel (SGK). Pengamatan menunjukkan sampel SGK memiliki penampang melintang berlapis lebih halus dibandingkan sampel S yang menunjukkan pola lebih halus.



Gambar 18.a. Foto permukaan SEM selulosa (S) (perbesaran 1000x)



Gambar 18.b. Foto permukaan SEM SGK (perbesaran 1000x)

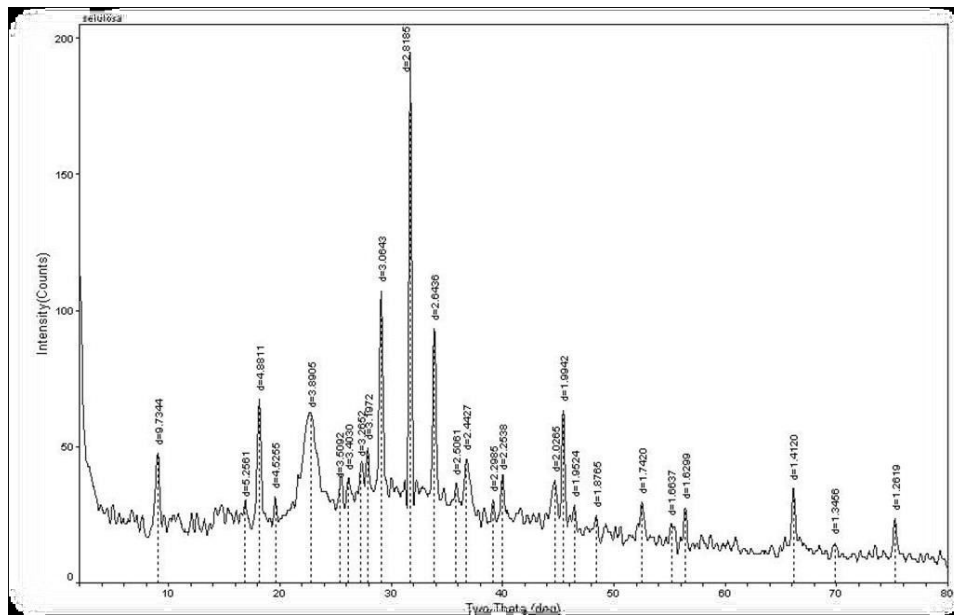
Hasil SEM dapat ditunjukkan dengan selulosa perbesaran 1000x. Jika dibandingkan dengan SGK (Gambar 18.b) permukaan kelompok S terlihat tidak merata ditunjukkan dengan adanya bukit dan lembah yang berlekuk-lekuk, sedangkan pada SGK permukaan terlihat lebih rata dan homogen. Hasil pada SGK memperlihatkan munculnya partikel-partikel kontras pada bagian permukaan. Partikel-partikel tersebut dimungkinkan adalah bentuk dari kitosan tidak terlarut dengan baik dan tertinggal di permukaan membran selulosa bakteri.

Struktur fibril penyusun matriks selulosa dan bakteri bentuk batang masih belum dapat terlihat seperti pada perbesaran 1000x yang dilaporkan Ciechanska, *et al.*, (2004). Pada pengujian antimikroba, tidak menutup kemungkinan bahwa partikel kitosan pada SGK lebih dapat mengaktivasi selulosa bakteri pada saat inkubasi, sehingga mampu menghasilkan zona hambat bakteri.

D. Analisis Kristalinitas dengan XRD

1. Ketela Rambat

Tujuan uji ini untuk melihat pengaruh pemberian kitosan terhadap kristalinitas dari selulosa bakteri. Selulosa bakteri memiliki kristalinitas tinggi (70-90%) (Cai *et al.* 2009), sedangkan kitosan merupakan suatu polimer yang bersifat semikristalin (Saputro dkk, 2009). Berikut disajikan difraktogram dari masing-masing sampel.

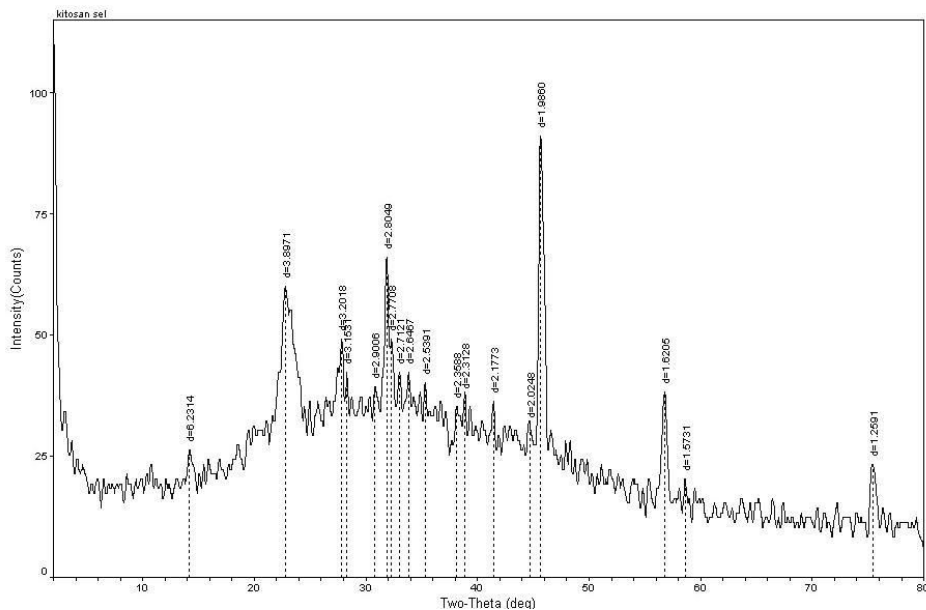


Gambar 19. Difraktogram selulosa bakteri

Gambar 19 menunjukkan adanya empat puncak dengan intensitas tinggi pada sudut $2\theta = 18,1^\circ; 22,8^\circ; 31,7^\circ$ dan $33,8^\circ$. Berdasarkan penelitian yang dikemukakan oleh Meshitsuka dan Isogai (1996) beserta Hon (1996) yang menyatakan bahwa signal difraksi yang utama dari selulosa bakteri terdapat di sekitar daerah $2\theta = 16,8^\circ; 22,6^\circ; 33,7^\circ; 34,9^\circ$ dimana pada daerah tersebut selulosa bakteri ini memiliki fase kristalin pada bidang 101,002 dan 040 sedangkan perkiraan nilai persen kristalinitas dari selulosa bakteri ini adalah 72%.

Persen kristalinitas selulosa bakteri dihitung dengan pendekatan luas segitiga. Luas kristal + luas amorf diperoleh dari luas total dibawah kurva – luas *background* lalu luas kristal dihitung dengan mengalikan tinggi puncak dengan FWHM yang diperoleh, lalu persen kristalinitas dihitung dengan menggunakan persamaan (4).

Gambar 20 menunjukkan adanya puncak dengan intensitas lemah pada sudut $2\theta = 14,2^\circ$. Puncak ini menunjukkan adanya kitosan yang berinteraksi dengan selulosa bakteri, hal ini sesuai dengan penelitian yang dikemukakan oleh Samuels (1981), yang menyatakan bahwa kitosan dengan BM rendah maupun tinggi ini memiliki puncak pada difraktogram di sekitar daerah $2\theta = 12^\circ$.



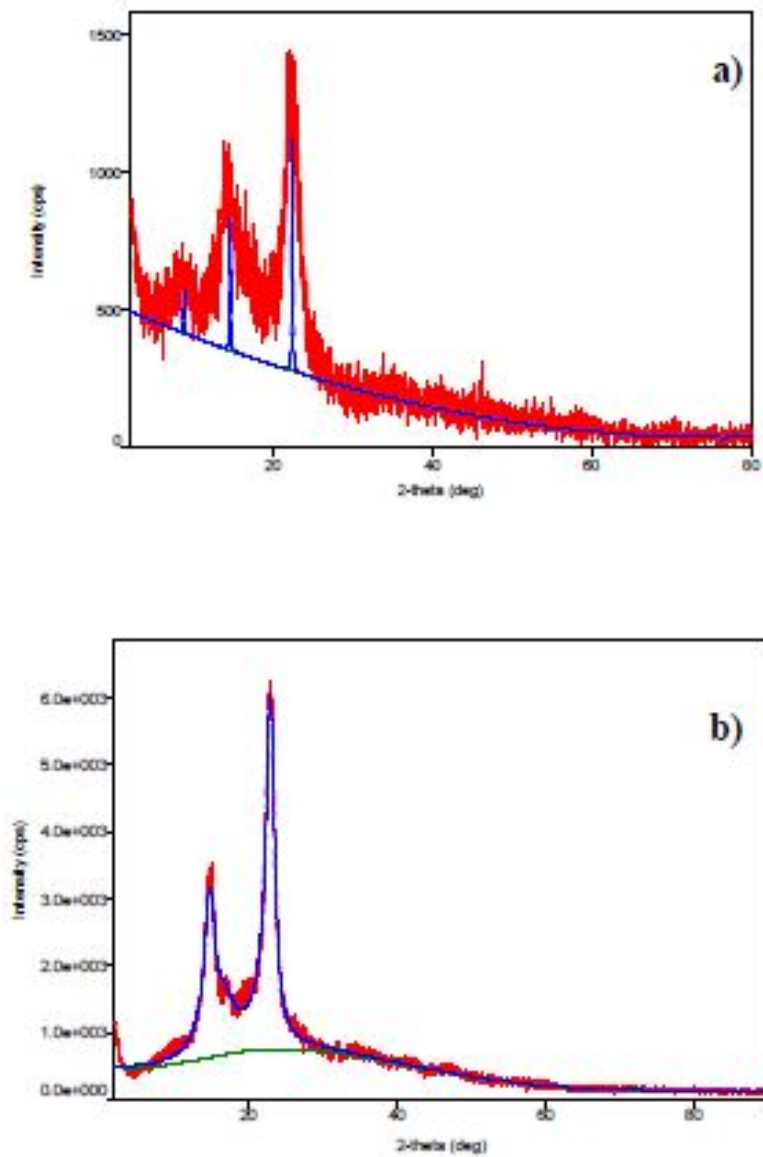
Gambar 20. Difraktogram Selulosa+kitosan+gliserol

Adanya puncak dengan intensitas tinggi di sekitar daerah $2\theta = 22,8^\circ$; $31,8^\circ$ dan $32,2^\circ$ ini menunjukkan adanya fase kristalin dari selulosa bakteri pada bidang 002 dan 040 sedangkan perkiraan nilai kristalinitas dari selulosa bakteri+gliserol+kitosan adalah 63%.

Penurunan nilai kristalinitas yang semula 72 % menjadi 63 % disebabkan adanya interaksi antara kitosan dengan selulosa bakteri. Penurunan ini sesuai dengan yang dikemukakan oleh Samuels (1981) bahwa kitosan mampu menurunkan kristalinitas dari selulosa bakteri karena adanya keberadaan kitosan yang bersifat amorf.

2. Air Cucian Beras

Analisis ini dilaksanakan untuk mengetahui informasi mengenai keadaan amorf dan kristalin pada sampel. Dari informasi tersebut, dapat dilihat secara kualitatif puncak 2 dari sampel yang digunakan. Hasil pembacaan XRD biomaterial selulosa dan biomaterial selulosa+kitosa dapat dilihat pada Gambar 21



Gambar 21. Difraktog XRD (a) selulosa (b) selulosa+kitosa

Meshitsuka dan Isogai (1996) beserta Hon (1996) menyatakan bahwa puncak-puncak kristalin selulosa bakteri ada pada daerah $2\theta = 16,8^\circ$; $22,6^\circ$; $33,7^\circ$; $34,9^\circ$. ada kemiripan puncak pada penelitian ini, yaitu pada daerah 2θ yang dihasilkan oleh membrane selulosa pada $8,84^\circ$, $14,63^\circ$ dan $22,46^\circ$. untuk membrane selulosa kitosan, dihasilkan daerah 2θ pada $14,8^\circ$ dan $23,0^\circ$. hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh

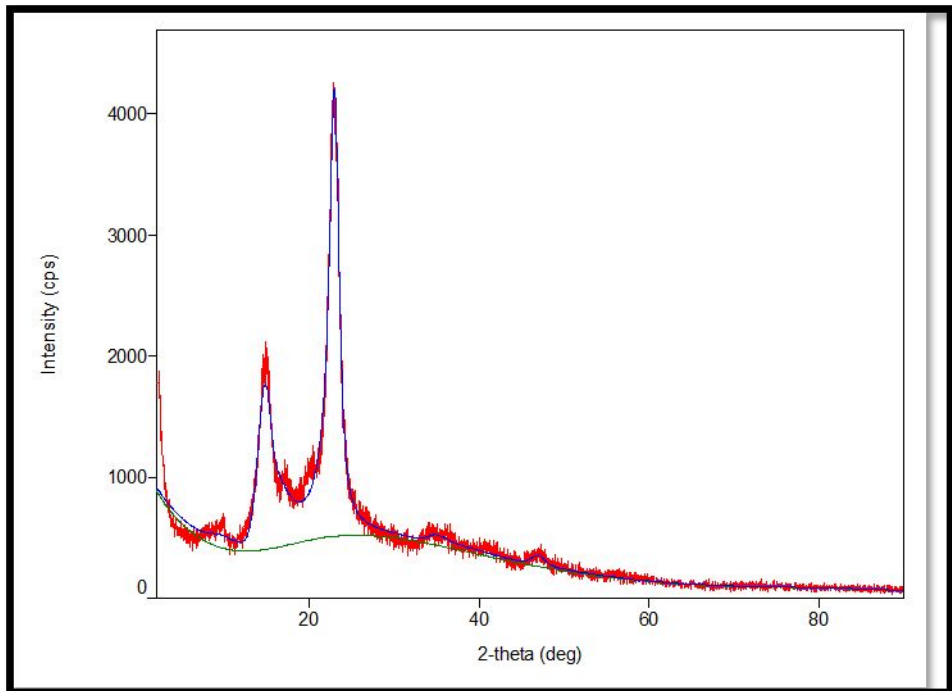
Dhawade, et al., (2012) dengan Teng et al., (2009) yang menyatakan bahwa peak karakterisasi kitosan berada pada $2\theta = 10,4^\circ$ dan 20° .

Hasil difraktogram ini sesuai teori bahwa selulosa mempunyai sifat kimia yang tinggi, sedangkan kitosan memiliki sifat amorf. Adanya sifat amorf dari kitosan yang masuk kedalam selulosa ini menyebabkan terjadinya penurunan kristanilitas. Penurunan ini dapat terlihat dari jumlah puncak yang berkurang dan menjadi lebih lebar. Penurunan derajat kristanilitas ini dapat mengakibatkan berubahnya sifat mekanik pada selulosa. Semakin rendah derajat kristalinitasnya, maka daya kuat putusnya juga akan semakin rendah. Adanya penambahan kitosan menyebabkan daya kuat putus biomatetial selulosa akan turun.

3. Ketela Pohon

Tujuan analisis ini untuk melihat pengaruh pemberian gliserol dan kitosan terhadap kristalinitas dari selulosa bakteri. Selulosa bakteri dan kitosan merupakan suatu polimer alam sehingga memiliki nilai kristalinitas tertentu. Selulosa bakteri merupakan suatu polimer yang memiliki nilai kristalinitas yang tinggi.

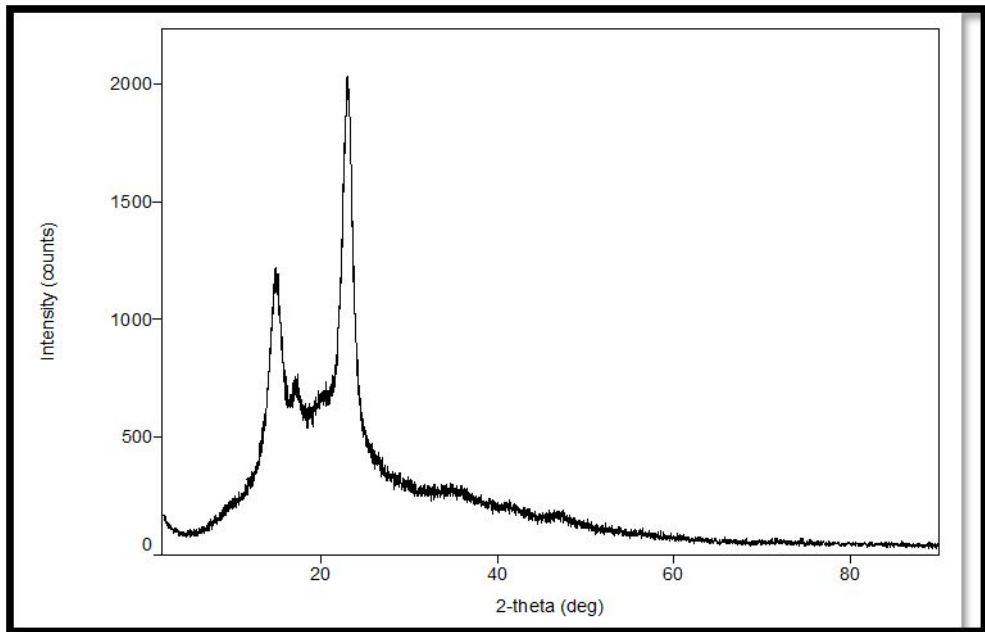
Menurut Cai *et. al.* (2009), selulosa bakteri memiliki kristalinitas tinggi (70-90%) sedangkan kitosan merupakan suatu polimer yang bersifat semikristalin (Saputro dkk., 2009), sehingga melalui uji ini apabila ada pengaruh maka akan terlihat adanya perbedaan dari difraktogram yang dihasilkan dari selulosa bakteri maupun selulosa bakteri+gliserol+kitosan beserta adanya perbedaan dari kristalinitas masing-masing sampel.



Gambar 22.a. XRD selulosa bakteri ketela pohon

Derajat kristalinitas sampel dihitung melalui perbandingan luas antara area kristalin dengan area total yang meliputi keseluruhan area (area kristalin + area amorf). Selulosa bakteri merupakan material polimer yang memiliki kristalinitas yang tinggi hingga mencapai 70 – 90 %. Berdasarkan penelitian Meshitsuka dan Isogai (1996) beserta Hon (1996) puncak – puncak kristalin selulosa bakteri muncul pada daerah $2\theta = 16,8^\circ$; $22,6^\circ$; $33,7^\circ$; $34,9^\circ$.

Difraktogram kelompok selulosa bakteri ketela pohon (Gambar 22.a.) menunjukkan kemiripan munculnya beberapa *peak* kristalin pada daerah $2\theta = 9,6^\circ$; $14,83^\circ$; $22,96^\circ$; $35,0^\circ$; $47,1^\circ$ yang memungkinkan telah diperoleh selulosa bakteri.



Gambar 22.b. XRD selulosa bakteri-glisierol-kitosan (SGK)

Hasil pada Gambar 22.b dapat ditemukan puncak pada daerah $2\theta = 14,83^\circ; 23,15^\circ$. Menurut Dhawade, *et al.*, (2012) beserta Teng *et al.*, (2009) peak karakteristik kitosan berada pada $2\theta = 10,4^\circ$ dan 20° . Pengamatan menunjukkan *peak* yang dihasilkan menjadi lebih amorf, yang tadinya pada selulosa bakteri diperoleh $9,6^\circ$ namun pada sampel SGK tidak diperoleh *peak* yang sama. *Peak* yang dihasilkan diduga saling berinteraksi satu sama lain ketika selulosa bakteri ditambahkan dengan kitosan, sehingga saling meniadakan. Data difraktogram dapat disimpulkan bahwa dengan penambahan kitosan, selulosa bakteri yang sebelumnya memiliki kristalinitas yang intensitasnya tinggi menjadi menurun intensitasnya. Hal ini berhubungan dengan aktivitas antimikroba dari selulosa bakteri+kitosan, yaitu kristalinitas menjadi menurun ketika ditambahkan kitosan dan membuat daerah amorf menjadi lebih banyak. Oleh karena itu, kitosan yang melekat pada selulosa bakteri dapat lepas dan mampu memiliki aktivitas antimikroba.

E. Pengujian Aktivitas Anti Mikroba

1. Ketela Rambat

Tujuan pengujian ini untuk mengetahui persen daya hambat dari membran selulosa yang sudah dimodifikasi dengan kitosan. Persen daya hambat sendiri prinsipnya adalah membandingkan antara diameter zona hambat selulosa+kitosan dengan diameter zona hambat kontrol positif, yang dalam pengujian ini menggunakan *amoxicillin*. Digunakan *amoxicillin* dikarenakan *amoxicillin* merupakan antibiotik yang dapat memberikan aktivitas anti mikroba terhadap *Staphylococcus aureus*.

Pengujian ini semua dilaksanakan di Laboratorium Balai Kesehatan Yogyakarta. Pelaksanaan ditempat tersebut dikarenakan ketersediaan bahan yang berupa media MHA (*Mueler Hilton Agar*), serta bakteri *Staphylococcus aureus*. Proses ini diawali dengan inokulasi bakteri *Staphylococcus aureus* pada media MH agar secara zig-zag. Setelah itu untuk mendapatkan kekeruhan yang diinginkan (0.5 McFarland) maka bakteri yang diinokulasikan tersebut diambil dengan jarum ose yang sebelumnya sudah dipijarkan, lalu dimasukkan ke dalam larutan fisiologis. Jarum ose perlu dipijarkan untuk menjamin sterilitas dari alat yang digunakan, agar yang tumbuh hanya bakteri *staphylococcus aureus*. Suspensi larutan fisiologis yang sudah diberi bakteri uji diukur kekeruhannya dengan alat *turbidity meter*.

Tujuan pengukuran ini adalah untuk mengetahui apakah suspensi yang dibuat sudah menyamai tingkat kekeruhannya. Digunakan kekeruhan 0.5 McFarland, dikarenakan berdasarkan pengalaman, bila menggunakan kekeruhan 1 MCFarland, maka bakteri yang tumbuh di media MHA terlalu banyak, sehingga menyulitkan dalam pengamatan. Adanya jumlah bakteri yang lebih sedikit, diharapkan dapat memudahkan pengamatan zona hambatnya.

Suspensi bakteri didapatkan dengan tingkat kekeruhan 0.5 McFarland, maka suspensi itu dimasukkan ke dalam media MHA secara aseptis. Keadaan yang aseptis diperlukan untuk mencegah

terkontaminasinya media oleh mikroorganisme lainnya. Cara untuk menjaga keadaan aseptis adalah dengan menyalakan api Bunsen, selalu memijarkan alat-alat yang akan digunakan, dan tidak berbicara saat melakukan perlakuan didepan media. Setelah suspensi bakteri dituang pada media, maka dilakukan perlakuan berikutnya dengan memasukkan kontrol positif (*amoxicillin* disk), kontrol negatif (asam asetat), serta potongan membrane selulosa, membran kitosan, dan membran selulosa+kitosan. Lalu didiamkan selama 24 jam yang merupakan waktu untuk membiarkan bakteri mengalami pertumbuhan di media MHA.

Menurut Tabel 11, dapat ditunjukkan bahwa membran selulosa tidak memiliki aktivitas anti mikroba, hal ini sesuai dengan penelitian Frankel, Serafica, dan Damien, (2004) yang menyebutkan bahwa membran selulosa bakteri tidak memiliki aktivitas anti mikroba, oleh karena itu perlu adanya penambahan senyawa tertentu untuk dapat memberikan aktivitas antimikroba. Berdasarkan pengamatan pada strukturnya, selulosa tidak memiliki gugus yang bebas yang dapat terprotonasi menjadi kationik alami, sehingga tidak dapat berikatan dengan biomolekul yang memiliki muatan negatif seperti dinding sel bakteri *Staphylococcus aureus* (Frankel, Serafica, dan Damien, 2004). Hasil yang didapat melalui pengujian ini dapat disajikan dalam Tabel 11.

Tabel 11. Hasil pengamatan aktivitas anti mikroba sampel biomaterial

Replikasi	Diameter Zona Hambat (mm)				
	Selulosa	Kitosan 2%	Selulosa+Kitosan 2%+gliserol	Amoxicilin	Asam Asetat
1	0	0	8	30	0
2	0	0	7	31	0
3	0	0	7	33	0
4	0	0	8	32	0
5	0	0	8	33	0

Rata-rata diameter	0	0	7.6	31.8	0
--------------------	---	---	-----	------	---

Gambar 23 menunjukkan bahwa membran selulosa tidak memiliki aktivitas anti mikroba, dikarenakan tidak adanya zona hambat di sekeliling membran selulosa bakteri. Selulosa bakteri tidak memiliki zona hambat karena bila dilihat dari strukturnya, selulosa bakteri tersusun atas glukosa yang merupakan nutrisi bagi bakteri untuk tumbuh, oleh karena itu selulosa bakteri tidak dapat memberikan aktivitas anti bakteri.



Gambar 23. Hasil pengamatan aktivitas anti mikroba membran selulosa

Menurut Tabel 11, terlihat bahwa membran kitosan tidak memiliki zona hambat. Hal ini dimungkinkan karena membran kitosan mengalami biodegradasi oleh bakteri *Staphylococcus aureus*. Biodegradasi ini disebabkan bakteri memiliki enzim yang dinamakan lysozym, merupakan enzim protease.

Penelitian Francis *et al.* (2000) dan Aiba (1992), mengatakan bahwa kecepatan degradasi berbanding terbalik dengan nilai derajat deasetilasi (DD), dan juga adanya gugus asetil akan membuat membran terdegradasi secara cepat oleh enzim. Penelitian sebelumnya bisa disimpulkan bahwa kitosan yang dipakai memiliki nilai derajat deasetilasi yang rendah, sehingga akan berakibat cepat terdegradasi oleh enzim lysozym. Nilai DD yang rendah menunjukkan masih adanya gugus asetil yang terdapat pada kitosan, semakin tinggi nilai DD, maka semakin menurun gugus asetil dan digantikan gugus amino.

Gugus amino tersebut yang berperan dalam aktivitas anti mikroba dengan berinteraksi pada permukaan membran bakteri. Semakin banyak gugus amino maka aktivitas anti mikroba dari kitosan juga semakin meningkat, sedangkan bila gugus asetil lebih banyak daripada gugus amino, maka aktivitas anti mikroba semakin menurun dan cenderung tidak mempunyai aktivitas.

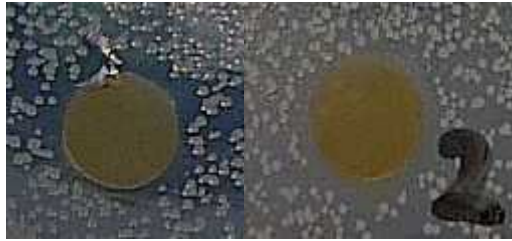
Menurut perhitungan, didapatkan nilai DD kitosan sebesar 74,94 %. Dapat dikatakan nilai DD yang lebih besar dari 70 % sudah baik, namun dalam penelitian ini menunjukkan bahwa nilai DD yang sebesar 74,94 % belum mampu menunjukkan aktivitas anti mikroba. Menurut Francis *et al.* (2000), kitosan dengan derajat deasetilasi 90% menunjukkan aktivitas anti bakteri hingga 84 %. Oleh karena itu kitosan yang digunakan perlu dilakukan deasetilasi kembali.



Gambar 24. Hasil pengamatan aktivitas anti mikroba membran kitosan

Gambar 24 menegaskan bahwa membran kitosan mengalami pelebaran, dalam hal ini berarti membran kitosan kemungkinan mengalami degradasi oleh enzim bakteri. Terlihat bahwa dibawah pelebaran kitosan ada bintik-bintik yang merupakan bakteri *Staphylococcus aureus*. Hal ini menyatakan bahwa membran kitosan yang dipakai tidak menghasilkan aktivitas anti bakteri.

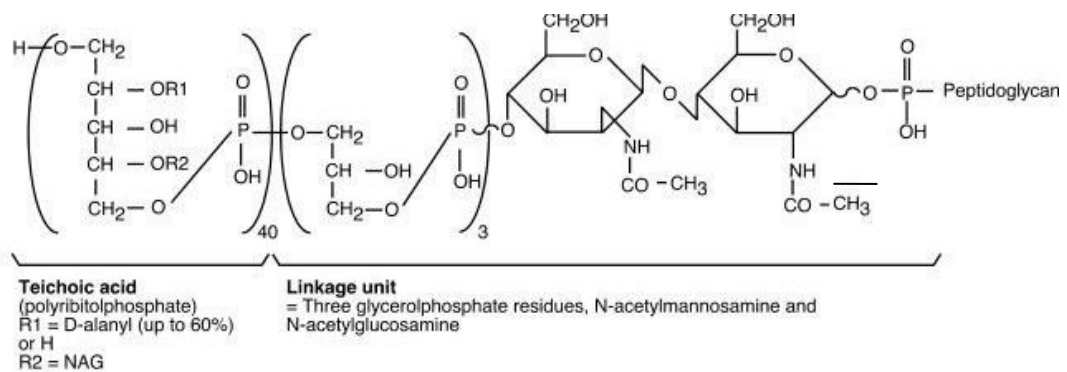
Tabel 11 juga menyatakan bahwa membran selulosa yang diberi penambahan kitosan ternyata memberikan aktivitas anti mikroba yang terlihat dari adanya zona hambat pada tiap replikasi.



Gambar 25. Hasil pengamatan aktivitas anti mikroba membran
Selulosa+Kitosan+gliserol

Gambar 25 menunjukkan bahwa membran selulosa yang ditambahkan kitosan memberikan aktivitas anti mikroba. Adanya aktivitas anti mikroba dapat dijelaskan melalui mekanisme anti mikroba seperti berikut. Kitosan yang melapisi membran selulosa memiliki gugus amino bebas. Gugus amino bebas akan terprotonasi membentuk polikationik dalam suasana asam, sehingga polisakarida kitosan bermuatan positif. Polikationik alami ini akan berkompetisi dengan ion Mg^{2+} untuk berinteraksi dengan gugus anionik pada dinding sel. Dinding sel bakteri bermuatan negatif sedangkan gugus amino yang terprotonasi bermuatan positif (NH_3^+). Interaksi ini akan membentuk lapisan *impermeable* di sekeliling sel bakteri. Lapisan *impermeable* ini akan menghalangi transport molekul yang diperlukan oleh sel bakteri, sehingga sel bakteri tidak dapat melakukan metabolisme, dan akhirnya pertumbuhannya terganggu (Helander, 2001). Mekanisme lainnya adalah partikel kitosan masuk ke dalam sel bakteri secara permeasi yang kemudian menuju nukleus untuk menghalangi proses sintesis RNA dan protein (Liu *et al.* 2001).

Bakteri gram positif memiliki muatan negatif disebabkan adanya asam teikoat yang bersifat asam dan mengandung ulangan rantai gliserol fosfat dan ribitol fosfat. Muatan negatif ini yang membuat gugus amino terprotonasi dari lapisan kitosan mampu berinteraksi dengan permukaan sel bakteri *Staphylococcus aureus*. Struktur asam teikoat ditunjukkan melalui Gambar 26.



Gambar 26. Struktur asam teikoat
(Fischer, 1988; Ruhland dan Fiedler, 1990)

Pengamatan struktur asam teikoat, menunjukkan gugus NH_3^+ dari kitosan akan berikatan secara ionik dengan gugus fosfat dari asam teikoat yang terdapat pada ribitol fosfat dan gliserol fosfat. Kitosan yang sudah berinteraksi dengan asam teikoat akan membentuk lapisan *impermeable* yang akan menghalangi masuknya molekul-molekul yang diperlukan sel bakteri untuk bertumbuh dan berkembang biak, sehingga akan menghambat pertumbuhan dari bakteri itu sendiri.

Mekanisme lainnya adalah kitosan yang belum terprotonasi (masih dalam bentuk NH_2) akan mengikat logam berupa Ca^{2+} dan Mg^{2+} untuk membentuk suatu kompleks. Hal tersebut mengakibatkan Ca^{2+} dan Mg^{2+} tidak dapat berikatan dengan asam teikoat ataupun lipopolisakarida. Hal ini akan mengakibatkan terganggunya proses transfer molekul ke dalam sel.

Menurut diameter zona hambat yang dihasilkan jika dikaitkan dengan ketentuan kekuatan anti bakteri yang diungkapkan Todar (1997), maka membran selulosa+kitosan mempunyai potensi anti mikroba dengan kekuatan sedang (diameter 5-10 mm), karena rata-rata diameter zona hambat adalah 7,6 mm. Perhitungan persen daya hambat dapat dilihat pada Tabel 12.

Tabel 12. Hasil perhitungan % daya hambat selulosa+kitosan+gliserol

Sampel	% daya hambat
Selulosa kitosan R1	27
Selulosa kitosan R2	23
Selulosa kitosan R3	21
Selulosa kitosan R4	25
Selulosa kitosan R5	24
Rata-rata % daya hambat	24

Hasil perhitungan ini, menunjukkan rata-rata persen daya hambat dari membran selulosa+kitosan adalah 24 %. Hal ini menunjukkan potensi aktivitas anti mikroba yang dimiliki membran selulosa yang dilapisi oleh kitosan.

Penggunaan kontrol negatif untuk membuktikan bahwa aktivitas anti mikroba yang dihasilkan bukan dari pengaruh pelarut yang digunakan, dalam hal ini adalah asam asetat yang digunakan untuk melarutkan kitosan. Hasil yang didapat adalah tidak adanya zona hambat pada daerah kontrol negatif, yang berarti pelarut yang digunakan tidak memberikan aktivitas antimikroba. Hal ini mempertegas bahwa zona hambat yang dihasilkan membran selulosa+kitosan+gliserol merupakan zona hambat yang berasal dari membran itu sendiri, tidak dipengaruhi oleh pelarut.

Kontrol positif digunakan sebagai pembanding yang menunjukkan bahwa senyawa antibiotik yang digunakan benar-benar dapat membunuh bakteri *Staphylococcus aureus*. Antibiotik yang digunakan yaitu *amoxicillin*. Alasan penggunaan *amoxicillin* adalah karena merupakan antibiotik spektrum luas yang bisa digunakan untuk bakteri gram positif seperti *Staphylococcus aureus* (Katzung, 2007)

Mekanisme kerja dari *amoxicillin* adalah dengan menghambat sintesis dinding sel bakteri. Mekanisme aksinya sama seperti penisilin dikarenakan amoxicillin merupakan turunan dari penisilin. *Amoxicillin* akan berikatan dengan *penicillin binding protein* (PDP) pada dinding sel

bakteri. Ikatan antara *amoxicillin* dengan dinding sel ini akan membuat sel bakteri tidak dapat membentuk dinding sel secara sempurna. Ketidaksempurnaan ini akan mengakibatkan sel bakteri mudah dimasuki oleh molekul-molekul besar lainnya, serta tidak mampu menjaga bentuk dinding selnya hingga akhirnya karena tidak tahan oleh tekanan (tekanan diluar sel lebih besar dari tekanan didalam sel) maka sel bakteri akan lisis (Katzung, 2007). Gambar 27 mempertegas bahwa *amoxicillin* mampu bertindak sebagai bakterisidal dengan potensi antimikrobia sangat kuat (>20 mm).



Gambar 27. Aktivitas anti mikroba amoxicillin

Berdasarkan Gambar 27 dapat diketahui bahwa zona hambat yang dihasilkan oleh *amoxicillin* paling besar diantara sampel lainnya. Hal ini dipertegas dengan rata-rata diameter zona hambat *amoxicillin* yaitu 31,8 mm.

2. Air Cucian Beras

Uji potensi anti mikroba dilaksanakan di Laboratorium Kesehatan Yogyakarta dengan menggunakan metode difusi *paper disk*. Bakteri yang diujikan adalah *Staphylococcus aureus*. Penggunaan bakteri ini dipertimbangkan sebab ia merupakan bakteri yang paling umum ditemukan di luka. menurut 3M health care, *skin and wound care division*,

mengatakan bahwa *Staphylococcus aureus* menimbulkan terjadinya luka pada kulit pasca operasi sebesar 30%, kemudian 13,7%nya adalah *coagulase-negative staphylococci*, 11,2%nya *Enterococcus spp*, 9,6% *Eschechia coli*, 5,6% *Pseudomonas aeruginosa*, 4,2% *Enterobacter spp*, 3,0% *Klebsiella pneumonia*, 2,0% *Candida spp*, 0,7% *Klesiella oxytoca*, 0,6% *Aciniella oxytoca*, 0,6% *Acinetobacter baumannii*.

Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui apakah biomaterial selulosa bakteri yang terbuat dari limbah cair cucian beras dan ditambah dengan kitosan ini memiliki potensi antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. Seluruh sampel biomaterial dipotong berbentuk lingkaran dengan diameter menyesuaikan panjang paper disk amoxicilin sebagai control positif, yaitu 0,7 mm. Media agar yang digunakan untuk penanamn bakteri *Staphylococcus aureus* ini adalah *Mueller Hinton* agar. Sesuai dengan yang dilakukan oleh Pudjarwoto (2008) bahwa dalam melakukan uji sensitivitas metode Kirby Bauer digunakan media selektif, yaitu media *Mueller Hinton* Agar.

Pembuatan koloni *Staphylococcus aureus* dengan kekeruhan 0,5 Mc Farland pada media BHI cair dilakukan paling. Alasan dipilih kekeruhan tingkat ini karena pada tingkat 1 Mc Farland ternyata menghasilkan kologi bakteri yang terlalu tebal pada media gagar yang akhirnya menyebabkan zona hambat biomaterial tidak efektif dan tidak terlihat dengan jelas. Selain itu lidi kapas Kirby beuer steril dimasukkan kedalam suspensi bakteri tersebut dan diolehkan secara merata keseluruhan permukaan media MHA (*Mueller Hinton* Agar). Disc antibiotik amoxicillin dan sampel biomaterial diletakkan pada permukaan media lalu dikubasi selama 24 jam dan diukur diameter zona hambatnya.

Peneliti melakukan beberapa kali orientasi, antara lain adalah orientasi pengukuran daya antimikroba terhadap biomaterial dengan penambahan kitosan sebesar 2% dan orientas pengukuran daya antimikroba pada larutan kitosan 2%, 4%, 6%, 8% dan 10%. Hasil yang ditunjukkan pada orientasi pengukuran daya antimikroba terhadap

biomaterial dengan penambahan kitosan sebesar 2% ternyata tidak menghasilkan adanya zona hambat.

Orienasi pengukuran daya antimikroba larutan kitosan 2%, 4%, 6%, 8% dan 10% tidak dihasilkan zona hambat pada konsentrasi 2-6%. Zona hambat hanya muncul pada larutan kitosan dengan konsentrasi 8% dan 10%. Pada konsentrasi 10% ternyata menunjukkan zona hambat yang lenih jelas, sehingga berdasarkan hasil orientasi tersebut, maka digunakan penambahan kitosan sebesar 10%. Zona hambat dapat dilihat pada Tabel 13.

Tabel 13. Zona daya hambat S,SK, K, Asetat dan Amoxicilin

Sampel	Replikasi	Diameter zona hambat (mm)
S	Replikasi 1	10
	Replikasi 2	13
	Replikasi 3	12
	Replikasi 4	13
	Replikasi 5	10
SK	Replikasi 1	10
	Replikasi 2	11
	Replikasi 3	13
	Replikasi 4	13
	Replikasi 5	12
K	Replikasi 1	-(meluber sampai 20)
	Replikasi 2	-(meluber sampai 20)
	Replikasi 3	-(meluber sampai 17)
	Replikasi 4	-(meluber sampai 22)
	Replikasi 5	-(meluber sampai 20)
Asetat (-)	Replikasi 1	-
	Replikasi 2	-

	Replikasi 3	-
	Replikasi 4	8
	Replikasi 5	-
Kontrol positif (+)	Replikasi 1	C
	Replikasi 2	40
	Replikasi 3	40
	Replikasi 4	40
	Replikasi 5	40

Data yang diperoleh dapat diamati pada tabel 13. Dari tabel tersebut, dapat dihitung rata-rata zona hambat yang dihasilkan oleh masing-masing sampel. Dari hasil tersebut, dapat dihitung rata-rata zona daya hambat yang dihasilkan oleh masing-masing sampel. Dari hasil tersebut, dapat dihitung rata-rata diameter zona daya hambat. Hasil rata-rata dapat dilihat pada Tabel 14

Tabel 14. Rata-rata Diameter Zona Hambat S, SK, K, Asetat dan Amoxicilin

Sampel	Penambahan kitosan 10% (mm)
S	11,6
SK	11,8
K	-
Asetat (-)	-
Amox (+)	40

Dari hasil zona hambat yang diperoleh juga dapat diketahui ada tidaknya perbedaan yang bermakna dan perbedaan yang tidak bermakna diantara ketiga sampel biomaterial. Pada table 15 menunjukkan hasil perhitungan statistic dari zona lambat yang dihasilkan oleh masing-masing sampel.

Berdasarkan hasil perhitungan statistic dapat dilihat bahwa ada perbedaan yang tidak bermakna diantara biometrial selulosa dan biometrial selulosa kitosan. Dengan demikian berarti penambahan kitosan 10% ini tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap aktivitas anti mikroba pada biomaterial selulosa kitosan

Tabel 15. Hasil Perhitungan Statistik dari Zona Hambat yang Dihasilkan

Sampel	S	SK	A	K	+
S	-	0.827 (BTB)	0.008 (BB)	0.005 (BB)	0.008 (BB)
SK	0.827 (BTB)	-	0.008 (BB)	0.005 (BB)	0.005 (BB)
A	0.008 (BB)	0.008 (BB)	-	0.005 (BB)	0.005 (BB)
K	0.005 (BB)	0.005 (BB)	0.005 (BB)	-	0.003 (BB)
+	0.008 (BB)	0.005 (BB)	0.005 (BB)	0.003 (BB)	-

Tabel 15 menunjukkan bahwa zona hambat hanya dihasilkan oleh biomaterial (selulosa+kitosan), selulosa dan control positif (*amoxicillin*). Dari Tabel 15 juga terlihat bahwa rata-rata zona hambat yang dihasilkan tidak berbeda jauh. Hal ini terjadi karena kemurnian kitosan yang digunakan masih terlalu rendah sehingga diperlukan konsentrasi kitosan yang lebih tinggi untk dapat memberikan efek anti mikroba. Penelitian ini menyatakan kemurnian kitosan yang digunakan ialah sebesar 74,94%. Sesuai dengan penelitian Takahashia, Imaia, Suzukia dan sawai, 92008) bahwa kitosn dengan nilai derajat deasetilasi yang tinggi akan memiliki muatan positif yang lebih banyak, sehingga kitosan akan lebih mudah menghambat pertumbuhan bakteri *S.aureus*. Kong, Chen, Liu, Meng, dan Yu (2008) juga menyatakan hal yang serupa, yaitu kitosan dengan DD

tinggi (97,5%) memiliki muatan positif lebih banyak daripada kitosan dengan DD rata-rata (83,7%). Muatan positif dari kitosan yang berperan memberikan efek anti bakteri pada kitosan, sehingga apabila kitosan yang digunakan tersebut kemurniannya kurang tinggi, maka muatan positif yang didapat dari gugus NH_3^+ juga akan lebih sedikit, sehingga daya anti mikrobanya juga akan rendah atau bahkan tidak dapat muncul

Wardaniati (2009) menyatakan bahwa polikation bermuatan positif dari kitosan mampu menghambat pertumbuhan mikroba dan mampu berinteraksi dengan senyawa-senyawa bermuatan negative seperti protein, polisakarida, asam nukleat, logam berat dan lain-lain. Hasil penelitian Liu (2004) menunjukkan bahwa kitosan dapat meningkatkan permeabilitas dari *outer* dan *inner membrane* yang akhirnya dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti terjadinya pelepasan isi sel bakteri. Kerusakan ini disebabkan karena adanya *electrostatic interaction* antara gugus NH_3^+ pada kitosan dengan muatan negative pada gugus *phosphoryl* di fosfolipid bilayer yang terdapat di membrane sel bakteri. Pembentukan suatu lapisan *impermeable* yang dapat menghalangi masuknya moleku-molekul yang dibutuhkan oleh bakteri untuk hidup ketika kitosan berinteraksi dengan asam teikoat. Interaksi antara kitosan dengan asam teikoat ini akan menghambat pertumbuhan dari bakteri itu sendiri.

Tabel 16, dapat menunjukkan zona hambat juga dihasilkan oleh membrane selulosa bakteri. Adanya zona hambat dari selulosa ini sesuai dengan teori kovalen koordinat, dimana gugus pereduksi dari selulosa akan berinteraksi dengan muatan positif yang terdapat pada dinding sel pada bakteri *Staphylococcus aureus*. Seperti yang telah dinyatakan oleh Liu, et al., (2004) bahwa pada dinding sel bakteri terdapat muatan positif seperti Mg^{2+} dan Ca^{2+} . Hal lain yang ditunjukkan adalah membran kitosan tidak memberikan zona hambat. Hal ini tidak sesuai teori yang menjelaskan bahwa kitosan memiliki aktivitas antimikroba. Namun, apabila dilihat kembali ikatan kompleks yang terjadi antara selulosa dan kitosan dengan membrane kitosan sendiri tanpa pencampuran dengan

selulosa, maka akan sesuai dengan penjelasan yang dinyatakan oleh Chechanska (2004). Chiechanska menjelaskan bahwa salah satu ciri kitosan adalah rentan terhadap enzim hidrolitik tertentu. *Lysozyme*, enzim yang ada didalam cairan tubuh manusia ini memiliki kemampuan untuk mendegradasi kitosan. Pada penelitiannya, *Staphylococcus aureus* juga memiliki enzim *lysozyme* yang akhirnya dapat mendegradasi kitosan. Sampel membran kitosan dalam penelitian ini dapat berubah wujud menjadi gel atau meluber.

3. Ketela Pohon

Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui % daya hambat dari membran selulosa yang sudah dimodifikasi dengan kitosan. Prinsip dari % daya hambat adalah membandingkan antara diameter zona hambat selulosa+kitosan dengan diameter zona hambat kontrol positif, yang dalam pengujian ini menggunakan amoxicillin. Menurut McEvoy (2002) Amoxicillin merupakan penisilin semi-sintetik oral yang secara struktur berhubungan dengan ampisilin dan digunakan untuk mengobati infeksi yang disebabkan oleh bakteri gram positif seperti *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococci*, *Listeria* dan *Staphylococcus* yang tidak menghasilkan penisilinase. Oleh karena itu, dalam penelitian ini digunakan *amoxicillin* dikarenakan amoxicillin merupakan antibiotik yang dapat memberikan aktivitas antimikroba terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

Pengujian ini dilakukan di Laboratorium Balai Kesehatan (BALKES) Jogjakarta, karena kelengkapan ketersediaan alat dan bahan percobaan seperti oven untuk menginkubasi, media MHA (*Mueler Hilton Agar*), serta bakteri *Staphylococcus aureus*. Pada tahap awal dilakukan pembuatan suspensi bakteri uji oleh pihak BALKES. Dengan cara sesuai yang dikemukakan oleh Christoforus (2010) bahwasolat murni *Staphylococcus aureus* ditambahkan ke dalam media Brain Heart Infusion broth (BHI broth) yang diinkubasi pada 37°C selama kurang lebih 4 jam

sampai kekeruhan *Brain Heart Infusion broth* (BHI broth) menyamai kekeruhannya 0,5 McFarland. Digunakan kekeruhan 0.5 McFarland, dikarenakan berdasarkan pengalaman, bila menggunakan kekeruhan 1 MCFarland, maka bakteri yang tumbuh di media MHA terlalu banyak, sehingga menyulitkan dalam pengamatan. Dengan kuantitas bakteri yang lebih sedikit, diharapkan dapat memudahkan pengamatan zona hambatnya.

Pembuatan media untuk uji aktivitas antimikroba. Pada penelitian ini menggunakan media yang digunakan untuk uji aktivitas antimikroba adalah MHA. Pembuatannya dengan cara larutan MHA dituangkan ke dalam 5 cawan petri masing-masing sebanyak 25 mL dan dibiarkan beberapa saat hingga memadat (Christoforus,2010). Selanjutnya, dilakukan penanaman bakteri, menurut Christoforus (2010) hasil suspensi bakteri uji *dispread* ke dalam media *Mueller-Hinton Agar* (MHA) dengan cara dioleskan secara merata dengan menggunakan lidi-kapas steril, lalu didiamkan kurang lebih selama 5 menit. Pada penelitian dilakukan hal yang sama, namun penanaman bakteri dengan cara mencelupkan lidi-kapas steril pada suspensi bakteri *S. aureus* kemudian mengoleskan pada media MHA secara zig-zag.

Uji aktivitas antimikroba pada penelitian ini, diharapkan dalam keadaan yang aseptis untuk mencegah kontaminasi pada media oleh mikroorganisme lain. Cara menjaga keadaan aseptis dapat dilakukan dengan menyalakan api Bunsen, selalu memijarkan alat-alat yang akan digunakan, dan tidak banyak bicara saat melakukan perlakuan didepan media. Pada tahap berikutnya adalah pemberian kontrol positif pada media bakteri uji. Sebagai kontrol positif, digunakan antibiotik amoxicillin (amoxicillin disk).Menurut Ardhuha dan Harapan (2010) bakteri uji yang sudah ditanamkan pada *Mueller-Hinton Agar* kemudian diberi *paper disc* amoxicillin.

Media bakteri dalam setiap cawan petri dilakukan perlakuan berikutnya dengan memasukkan kontrol negatif (asam asetat), potongan membran selulosa, membran kitosan, dan membran selulosa+kitosan.

Kemudian inkubasikan pada 37°C selama 24 jam. Lama waktu 24 jam merupakan waktu untuk membiarkan bakteri mengalami pertumbuhan di media MHA.

Setelah diinkubasikan selama 24 jam, dilakukan pengamatan serta pengukuran diameter zona hambat dari masing-masing sampel. Pengukuran zona hambat dilakukan dengan mengukur diameter zona hambat dalam millimeter, kemudian dihitung persentase kekuatan aktivitas daya hambat sesuai yang dikemukakan oleh Arduha dan Harapan (2010). Tabel 16 menunjukkan hasil pengamatan diameter zona hambat pada setiap sampel uji. Pada hasil pengujian aktivitas antimikroba kelima petri tersebut, setiap petri berisi *amoxicillin*, kitosan, membran selulosa bakteri, selulosa bakteri + gliserol + kitosan 2% (SGK 2%), dan Asam asetat.

Tabel 16 menunjukkan membran selulosa tidak memiliki aktivitas antimikroba dikarenakan tidak diperoleh zona hambat (Gambar 19). Hal ini sesuai dengan penelitian Frankel, Serafica, Damien, (2004) yang menyebutkan bahwa membran selulosa bakteri tidak memiliki aktivitas antimikroba, oleh karena itu perlu adanya penambahan senyawa tertentu untuk dapat memberikan aktivitas antimikroba. Bila dilihat dari strukturnya, selulosa tidak memiliki gugus yang bebas yang dapat terprotonasi menjadi kationik alami.

Tabel 16. Hasil pengamatan aktivitas antimikroba sampel biomaterial

No	Sampel	Replikasi	Diameter Zona hambat (mm)
1	Selulosa	1	0
		2	0
		3	0
		4	0
		5	0

2	Kitosan 2%	1	0
		2	0
		3	0
		4	0
		5	0
3	Selulosa+kitosan 2%	1	11
		2	9
		3	8
		4	10
		5	6
	Rata-rata	8,8	
4	Amoxicilin	1	37
		2	36
		3	34
		4	36
		5	32
	Rata-rata	35	
5	Asam asetat	1-5	Tidak ada

Gambar 28 menegaskan bahwa membran selulosa tidak memiliki aktivitas antimikroba, dikarenakan tidak adanya zona hambat di sekeliling membran selulosa bakteri. Akan tetapi, pada pengamatan sampel selulosa bakteri pada penelitian ini, dapat dilihat struktur membran seperti terurai atau terbiodegradasi ditegaskan pada Gambar 29.



Gambar 28. Hasil pengamatan aktivitas antimikroba membran selulosa



Gambar 29. Hasil pengamatan biodegradasi membran selulosa

Hal ini dapat dijelaskan sesuai yang dikemukakan oleh Krystynowicz (2001) bahwa selulosa bakteri mempunyai beberapa keunggulan antara lain: kemurnian tinggi, derajat kristalinitas tinggi, mempunyai kerapatan antara $300-900 \text{ kg/m}^3$, kekuatan tarik tinggi, elastis, dan terbiodegradasi.

Tabel 16 menunjukkan membran kitosan tidak memiliki zona hambat. Hal ini dimungkinkan karena membran kitosan mengalami biodegradasi oleh bakteri *Staphylococcus aureus*. Biodegradasi ini dikarenakan bakteri memiliki enzim yang dinamakan lysozym, merupakan enzim protease.

Berdasarkan penelitian Francis *et al* (2000) dan penelitian Aiba (1992), mengatakan bahwa kecepatan degradasi berbanding terbalik dengan nilai derajat deasetilasi (DD), dan juga tidak adanya gugus asetil akan membuat membran terdegradasi secara perlahan oleh enzim. Kesimpulan yang didapatkan adalah kitosan yang dipakai memiliki nilai derajat deasetilasi yang rendah, akan berakibat cepat terdegradasi oleh

enzim lysozym. Selain itu nilai derajat deasetilasi yang rendah akan mengakibatkan kurangnya kemampuan membran kitosan untuk berinteraksi dengan membran bakteri. Nilai DD yang rendah menunjukkan masih adanya gugus asetil yang terdapat pada kitosan, semakin tinggi nilai DD, maka semakin berkurang gugus asetil dan digantikan gugus amino. Gugus amino inilah yang berperan dalam aktivitas antimikroba dengan berinteraksi pada permukaan membran bakteri.

Menurut perhitungan yang didapatkan nilai DD kitosan sebesar 74,937 %. Dapat dikatakan nilai DD yang lebih besar dari 70 % sudah baik, namun dalam penelitian ini menunjukkan bahwa nilai DD yang sebesar 74,937 % belum cukup besar untuk menunjukkan aktivitas antimikrobanya. Menurut Jung *et al.* (1998), kitosan dengan derajat deasetilasi 90% menunjukkan aktivitas antibakteri hingga 84 %. Kitosan yang digunakan perlu dilakukan pemurnian kembali.

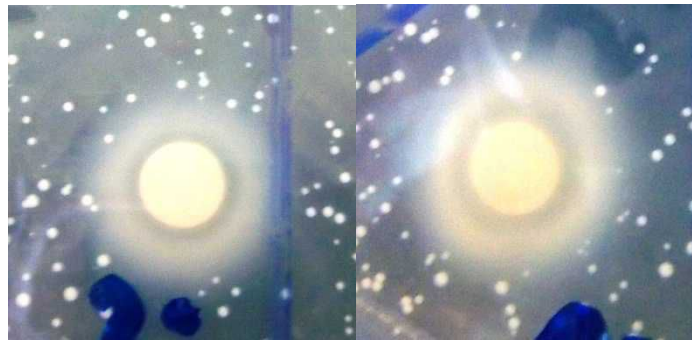


Gambar 30. Hasil pengamatan aktivitas antimikroba membran kitosan

Kitosan sebagai antibakteri sudah dibuktikan dari beberapa penelitian sebelumnya (Tsai *et al.* 2000; No *et al.* 2002; Liu *et al.* 2006; Rifaat 2008). Menurut Thatte (2004), aktivitas antibakteri kitosan dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu sumber kitosan, unit monomer yang menyusun kitosan, mikroba yang diuji, derajat deasetilasi, pH media tumbuh, bobot molekul kitosan, keberadaan ion logam bebas, dan kondisi lingkungan (kadar air, nutrisi yang tersedia bagi mikroba). Penelitian ini

dapat dimungkinkan faktor-faktor tersebut ikut berperan dalam hal kitosan yang tidak mampu memberikan aktivitas antimikroba.

Gambar 30 menunjukkan bahwa pada membran kitosan tidak terbentuk zona hambat dan didekat sekitar membran tersebut terdapat bakteri uji, yaitu *Staphylococcus aureus*. Keadaan tersebut menyatakan bahwa membran kitosan yang dipakai tidak menghasilkan aktivitas antibakteri.



Gambar 31. Hasil pengamatan aktivitas antimikroba membran selulosa+kitosan

Tabel 16 juga menunjukkan bahwa membran selulosa yang diberi penambahan kitosan ternyata memberikan aktivitas antimikroba yang tampak dari adanya zona hambat pada setiap replikasi. Terlihat pada Gambar 31 menunjukkan ada bagian jernih, yang disebut zona radikal dan bagian yang keruh disebut zona iradikal. Ikatan antara selulosa bakteri dengan kitosan tidak terlalu kuat sehingga pada saat inkubasi 37°C selama 24 jam, kitosan dapat terlepas dari selulosa bakteri dan menghasilkan zona hambat. Penelitian ini dapat diamati ada kemungkinan selulosa bakteri berperan sebagai pembawa zat aktif dari kitosan. Membran selulosa bakteri yang dilapisi kitosan dapat memberikan aktivitas antimikroba. Kitosan dimungkinkan menyebar ke sekitar membran, menjadi karakteristiknya yang dapat berperan sebagai antimikroba.

Kitosan dianggap sebagai bakterisidal (pembunuh bakteri) atau bakteriostatik (menghambat pertumbuhan bakteri tetapi tidak berarti apakah dapat membunuh bakteri). Data terbaru dalam literatur memiliki

kecenderungan untuk mengkarakterisasi kitosan sebagai bakteristatik daripada bakterisida, meskipun mekanisme yang tepat belum sepenuhnya dipahami dan beberapa faktor pendukung aksi antibakteri (Goy *et al.* 2009).

Mekanisme penghambatan kitosan dan turunannya sebagai senyawa antimikroba belum diketahui secara pasti, namun beberapa peneliti mengklasifikasikan menjadi 3, meliputi (1) interaksi dengan membran sel, yaitu kitosan merupakan polikation yang dapat berikatan dengan muatan negatif dari membran sel bakteri melalui interaksi elektrostatis, sehingga mempengaruhi permeabilitas membran sel dan mengakibatkan terjadinya kebocoran bahan-bahan intraseluler seperti enzim, protein, materi genetik, dan lain-lain; (2) inaktivasi enzim-enzim penting, yaitu kitosan berikatan dengan DNA dan menghambat mRNA dalam sintesis protein; dan (3) merusak bahan-bahan genetik mikroba, yaitu kitosan sebagai pengkelat logam mampu mengikat ion-ion logam pada larutan intrasel yang berperan penting bagi kelangsungan hidup sel bakteri (Goy *et al.* 2009).

Aktivitas antimikroba dapat dijelaskan melalui mekanisme antimikroba seperti berikut. Kitosan yang melapisi membran selulosa memiliki gugus amino bebas. Sisi aktif kitosan terdapat pada gugus amina, karena jika dilarutkan dalam asam asetat atau asam organik lainnya akan bermuatan positif sangat kuat, sehingga semakin banyak gugus amina, maka makin banyak pula muatan positifnya. Muatan positif ini yang akan berinteraksi dengan muatan negatif bakteri, yaitu dapat menarik molekul asam amino (asam aspartat dan asam glutamat) pembentuk protein dalam membran sel bakteri sehingga menyebabkan kebocoran membran intrasel. Gugus fungsional amina juga memiliki pasangan elektron bebas sehingga dapat menarik mineral Mg^{2+} yang terdapat pada ribosom dan mineral Ca^{2+} yang terdapat pada dinding sel mikroba dengan membentuk ikatan kovalen koordinasi. Kedua hal tersebut menjadikan kitosan dapat mengakibatkan

timbulnya kebocoran konstituen intraseluler sehingga mikroba akan mati (Yulina, 2011).

Helander (2001) mengatakan gugus amino bebas akan terprotonasi membentuk polikationik, sehingga polisakarida kitosan bermuatan positif. Polikationik alami ini akan berinteraksi dengan gugus anionik pada permukaan sel. Permukaan sel bakteri bermuatan negatif sedangkan gugus amino yang terprotonasi bermuatan positif (NH_3^+). Adanya interaksi ini akan membentuk lapisan *impermeable* di sekeliling sel bakteri. Lapisan *impermeable* ini akan menghalangi transport molekul yang diperlukan oleh sel bakteri, sehingga sel bakteri tidak dapat melakukan metabolisme, dan akhirnya pertumbuhannya terganggu.

Keberadaan air terhadap mikroba sangatlah penting. Air mempengaruhi pertumbuhan mikroba dan jumlah air yang tersedia memiliki kaitan yang erat dengan pertumbuhan mikroba di dalamnya disamping sebagai penyusun utama mikroba. Jika kandungan air suatu bahan diturunkan, maka pertumbuhan mikroba akan diperlambat. Oleh karena itu, keberadaan kitosan yang mampu mengikat air menyebabkan pertumbuhan mikroba dalam suatu makanan (media) menjadi terhambat.

Banyak kemungkinan lain tentang aktivitas antibakteri adalah polikation molekul kitosan berinteraksi dengan komponen anionik dinding sel mikrobial (lipopolisakarida dan protein) secara dominan, yang menghasilkan kerusakan komponen intraseluler karena perubahan permeabilitas, terjadi pencegahan masuknya nutrisi ke dalam sel; berikatan dengan DNA kemudian menghambat RNA dan sintesis protein; berikatan melalui interaksi hidrofobitas. Zhang *et al.* (2003) menyebutkan bahwa aktivitas antibakteri oleh kitosan dapat melalui beberapa mekanisme, yaitu: pertama, polikation kitosan mengganggu metabolisme bakteri dengan melapisi permukaan sel bakteri. Kedua, kitosan mengikat DNA bakteri untuk menghambat sintesis RNA.

Liu *et al.* (2006) menyatakan bahwa aktivitas antibakteri kitosan melalui flokulasi sehingga membunuh bakteri. Aktivitas antibakteri dapat

melalui cara membunuh mikroorganisme (bakteriosidal) dan atau penghambat pertumbuhan mikroorganisme (bakteriostatik) dengan jalan menghancurkan atau mengganggu dinding sel, menghambat sintesis dinding sel, menghambat sintesis protein dan asam nukleat, merusak DNA, denaturasi protein, menghambat aktivitas enzim.

Staphylococcus aureus termasuk jenis bakteri gram positif. Menurut Pelzardan Chan (1986), struktur dinding bakteri gram positif relatif sederhana sehingga memudahkan senyawa antibakteri menemukan sasaran untuk bekerja. Bakteri gram positif memiliki muatan negatif dikarenakan adanya asam teikoat yang bersifat asam dan mengandung ulangan rantai gliserol fosfat dan ribitol fosfat. Adanya muatan negatif ini yang membuat gugus amino terprotonasi dari lapisan kitosan mampu berinteraksi dengan permukaan sel bakteri *Staphylococcus aureus*. Hasil dari pengamatan zona hambat pada penelitian ini, diameter zona hambat masing-masing replikasi adalah 11; 9; 8; 10; dan 6 (mm) dengan rata-rata diameter sebesar 8,8mm. Berdasarkan diameter zona hambat yang dihasilkan jika dikaitkan dengan ketentuan kekuatan antibakteri yang diungkapkan Todar (1997), maka membran selulosa+gliserol+kitosan (SGK) mempunyai potensi antimikroba dengan kekuatan sedang (diameter antara 5-10mm).

Tabel 17. Hasil perhitungan % daya hambat selulosa+gliserol+kitosan masing-masing replikasi

Sampel	% daya hambat
Selulosa kitosan R1	30
Selulosa kitosan R2	25
Selulosa kitosan R3	24
Selulosa kitosan R4	28
Selulosa kitosan R5	19

Tabel 17 menunjukkan % daya hambat selulosa+gliserol+kitosan masing-masing replikasi. Menurut hasil perhitungan ini, % daya hambat dari membran selulosa+kitosan berkisar antara 19-30%. Rata-rata % daya hambat SGK adalah 25,2% dari amoxicillin ini menunjukkan adanya potensi yang dimiliki membran selulosa yang dilapisi oleh kitosan.

Hasil pengamatan kontrol negatif untuk menunjukkan bahwa aktivitas antimikroba yang dihasilkan bukan dari pengaruh pelarut yang digunakan, dalam hal ini adalah asam asetat yang digunakan untuk melarutkan kitosan ditunjukkan pada gambar 32. Hasil yang didapat adalah tidak adanya zona hambat pada daerah kontrol negatif, yang berarti pelarut yang digunakan tidak memberikan aktivitas antimikroba.



Gambar 32. Hasil pengamatan aktivitas antimikroba kontrol negatif asam asetat



Gambar 33. Hasil pengamatan aktivitas antimikroba kontrol positif amoxicillin

Penelitian ini menggunakan kontrol positif yaitu amoxicillin. Gambar 33 menunjukkan bahwa amoxicillin sebagai kontrol positif dapat memberikan aktivitas antimikroba dengan terbentuknya zona hambat di

sekitar disk dari amoxicillin. Hasil dari pengamatan zona hambat pada penelitian ini, diameter zona hambat masing-masing replikasi adalah 37; 36; 34; 36; dan 32 (mm) dengan rata-rata diameter sebesar 35mm. Berdasarkan diameter zona hambat yang dihasilkan jika dikaitkan dengan ketentuan kekuatan antibakteri yang diungkapkan Todar (1997), maka amoxicillin mempunyai potensi antimikroba dengan kekuatan sangat kuat (diameter > 20 mm).

F. Uji Penyembuhan Luka

1. Ketela Pohon

Uji penyembuhan luka dilakukan dengan pengamatan makroskopis baik secara kualitatif (pengamatan kelembaban, keropeng, dan warna luka) dan pengukuran kuantitatif (pengukuran diameter, perubahan diameter, dan perubahan luas daerah luka).

Tabel 18. Pengamatan kualitatif makroskopis ketiga kelompok pada periode perlakuan 1, 3, 5, dan 7 hari

Kelompok	Periode	Kelembaban	Keropeng	Warna
SGK	1 Hari	Basah	Tidak ada	Merah
	3 Hari	Kering	Ada	Kuning
	5 Hari	Kering	Ada	Coklat kehitaman
	7 Hari	Kering	Ada	Coklat
K	1 Hari	Basah	Tidak ada	Merah
	3 Hari	Kering	Ada	Kuning
	5 Hari	Kering	Ada	Coklat
	7 Hari	Kering	Ada	Coklat
O	1 Hari	Basah	Tidak ada	Merah
	3 Hari	Basah	Tidak ada	Kuning, terbentuk <i>pus</i>
	5 Hari	Kering	Ada	Kuning kecoklatan

	7 Hari	Kering	Ada	Coklat
--	--------	--------	-----	--------

Keterangan : Kelompok SGK = Selulosa Gliserol Kitosan, K = Kitosan, O = Kontrol negatif

Hasil pengamatan kualitatif makroskopis (Tabel 18) menunjukkan terdapat perbedaan pada ketiga peubah yang diamati. Pengamatan 1 hari menunjukkan luka yang masih merah dan basah pada ketiga kelompok yang berarti bahwa luka masih belum terintegrasi dan proses yang terjadi adalah fase akut inflamasi trauma, yaitu ditunjukkan dengan warna merah yang merupakan dilatasi kapiler pembuluh darah. Pada pengamatan 3 hari terdapat perbedaan pada kelompok SGK dan K terhadap kontrol untuk ketiga peubah yaitu kelembaban, keberadaan keropeng, dan warna luka. Kelompok SGK dan K menunjukkan percepatan pengeringan luka yang ditunjukkan pengeringan luka berlangsung pada 3 hari setelah perlukaan, sementara pada kelompok O (kontrol negatif) pengeringan terjadi setelah 5 hari.

Berdasarkan pengamatan dari keberadaan keropeng yang berkaitan langsung dengan proses *clotting* dan pengeringan luka, juga terdapat perubahan pada kedua kelompok (SGK dan K) terhadap kontrol yang ditunjukkan dengan keberadaan keropeng pada hari ke – 3. Pada pengamatan warna, kelompok O menunjukkan warna kuning pada hari ke – 3 disertai dengan pembentukan *pus*, hal ini membuktikan adanya infeksi pada luka O yang menyebabkan pembentukan *pus* yang merupakan *debris* dari jaringan *nekrotik* dan sistem imun. Proses ini disebut dengan fase infiltrasi leukosit, yang melibatkan peningkatan permeabilitas vaskular dan migrasi leukosit misalnya *Polymorphonuclear Leukocytes* (PMNL), monosit, limfosit, dan sel darah putih lainnya. Keberadaan infeksi tersebut diatas dapat menyebabkan penurunan laju penyembuhan luka karena adanya infeksi oleh bakteri dapat mengganggu respon penyembuhan tubuh terhadap trauma. Salah satu bakteri yang memiliki kemungkinan besar menginfeksi daerah luka adalah *Staphylococcus*

aureus yang merupakan flora normal kulit, bakteri ini dapat menghasilkan toksin yang mengakibatkan proses pembekuan darah terhambat. Teori ini memiliki kemiripan dengan hasil penelitian yang menunjukkan bahwa pembentukan keropeng pada kontrol O mengalami penghambatan. Sedangkan pada kelompok SGK dan K menunjukkan adanya pengeringan dan penyembuhan luka sejak hari ke – 3 setelah eksisi, warna coklat menegaskan bahwa proses *clotting*, dan infiltrasi leukosit telah selesai, dan dilanjutkan dengan proses *remodelling* jaringan luka dengan membentuk jaringan ikat fibroblast baru.

Tabel 19. Penyembuhan luka pada pengamatan 3, 5, dan 7 hari

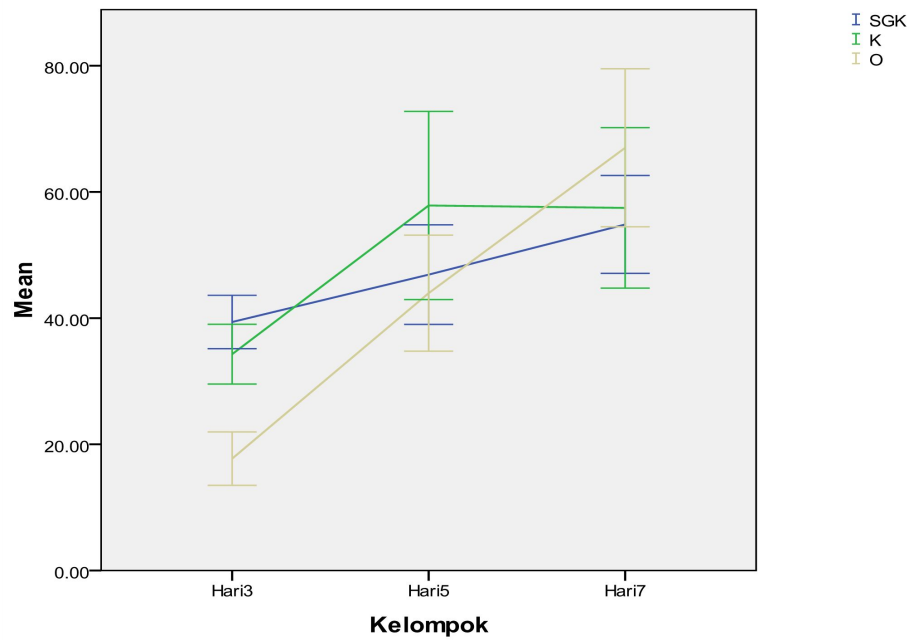
No.	Kelompok	Rerata laju penyembuhan		
		3 Hari	5 Hari	7 Hari
1.	SGK	39,39 ± 4,23 ^a	46,89 ± 7,89 ^a	54.84 ± 7,75 ^a
2.	K	34,29 ± 4,74 ^a	57,85 ± 14,91 ^a	57.47 ± 12,72 ^a
3.	O	17,73 ± 4,24 ^b	43,96 ± 9,19 ^a	70,00 ± 12,51 ^a

Huruf *superiscript* yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata ($p > 0, 05$)

Tabel 19, menggambarkan laju penyembuhan luka pada pengamatan 3, 5, dan 7 hari setelah perlukaan eksisi. Hasil analisis statistik (Tabel 19) menunjukkan deviasi yang cukup besar pada beberapa kelompok. Besarnya nilai ini merupakan suatu kelemahan metode yang ditemukan dalam penelitian, bahwa variasi diameter awal (D_1) yang berbeda dapat mempengaruhi hasil akhir penelitian yang dinyatakan dalam kecepatan penyembuhan luka.

Proses perubahan laju penyembuhan luka tiap kelompok perlakuan terhadap hari pengamatan ditampilkan dalam Gambar 34. Ketiga kelompok (SGK, K, dan O) mengalami peningkatan proses penyembuhan luka dari pengamatan 3 hari ke pengamatan 5 hari. Pengamatan 7 hari menunjukkan peningkatan proses penyembuhan luka pada kelompok SGK

dan O, tetapi kelompok K sudah tidak menunjukkan perubahan. Adanya selulosa bakteri dalam kelompok SGK kemungkinan berperan dalam mempertahankan aktivitas penyembuhan luka yang dibuktikan dengan adanya peningkatan laju penyembuhan luka sampai dengan pengamatan 7 hari.



Gambar 34. Grafik perubahan proses laju penyembuhan ketiga kelompok. Keterangan : SGK = selulosa gliserol kitosan; K = kitosan; O = kontrol negatif

Analisis statistik pada (Tabel 19) menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok pada pengamatan 3 hari, sementara pada pengamatan 5, dan 7 hari tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan antar ketiga kelompok. Pengamatan 3 hari, menunjukkan beda nyata kelompok SGK dan kelompok K terhadap kelompok O. Pemberian biomaterial yang mengandung kitosan dapat meningkatkan laju penyembuhan luka pada pengamatan 3 hari. Hal ini sesuai dengan teori bahwa kitosan dapat meningkatkan regenerasi luka melalui aktivitas *immunomodulator*, dan dapat mencegah infeksi mikroorganisme yang menunda penyembuhan luka karena kitosan juga memiliki aktivitas

antibakteri. Hasil uji statistik ini menegaskan uji kualitatif yang telah dilakukan, bahwa pemberian kelompok SGK dan kelompok K dapat mempercepat fase akut inflamasi dan pengeringan luka terbuka.

Hasil pengamatan 5 hari dan 7 hari, tidak terlihat perbedaan yang signifikan antar ketiga kelompok (kelompok SGK, kelompok K, dan kelompok O). Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian biomaterial SGK dan K tidak memiliki efek yang lebih baik dibandingkan dengan kontrol negatif (kelompok O). Adanya perbedaan tidak bermakna ini dapat disebabkan oleh adanya perlakuan kelompok SGK dan K pada pengamatan 5 dan 7 hari justru membatasi aerasi (oksigenasi) daerah luka sehingga proses respirasi dan metabolisme sel fase maturasi jaringan luka terhambat. Hambatan ini meniadakan fungsi *immunomodulator* kitosan yang terlihat pada pengamatan 3 hari. Faktor lain yang dapat berperan adalah pada kelompok O, ketika luka sudah mengalami pengeringan (yang ditunjukkan dengan terbentuknya keropeng), jaringan luka menjadi lebih kebal terhadap infeksi mikroorganisme, karena adanya proses *clotting* yang mencegah kontak jaringan luka dengan atmosfer. Akibatnya proses penyembuhan luka mengalami peningkatan pada kelompok O.

BAB V

SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan

1. Pembuatan selulose bakteri dengan pemlastis gliserol kadar rendah yaitu 0,5% dan ditambah kitosan 2% dari berbagai limbah rumah tangga berpengaruh terhadap sifat material selulosa.
2. Selulose bakteri dari berbagai limbah rumah tangga yang ditambah kitosan 2% dengan pemlastis gliserol 0,5% mempunyai daya hambat terhadap bakteri staphilococcus aereus
3. Selulose bakteri dari limbah ketela pohon yang ditambah kitosan 2% dengan pemlastis gliserol 0,5% berpengaruh terhadap penyembuhan awal luka pada tikus galur wistar.

B. Saran

1. Perlu dilakukan pengukuran berat moluker biomaterial yang dihasilkan.
2. Perlu pemberian kombinasi gliserol dan asam oleat pada selulose bakteri dan berbagai bahan limbah rumah tangga.
3. Perlu dilakukan uji penyembuhan luka pada kulit dengan waktu yang lebih lama dari 7 hari sehingga pengamati bisa proses penyembuhan luka secara total.
4. Perlu dilakukan pembuatan preparat histologi dari kulit yang mengalami luka untuk dapat mengamati proses penyembuhan luka tersebut secara mikroskopis.

DAFTAR PUSTAKA

- Aiba S. Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosans. *I J Biol Macromol* 1992; 14(4): 225-8.
- Anicuta, S-G, Dobre, L., Stroescu, M. and Iuliana Jipa, I., 2010, Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy For Characterization of Antimicrobial Films Containing Chitosan, *Research*, Faculty Applied Chemistry and Material Science, University Politehnica of Bucharest, Romania.
- Ardhuha, F., Harapan, 2010, Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Metanol Daun *Syzygium cordatum* terhadap *Eschericia coli* dan *Staphylococcus aureus* Menggunakan Metode Kirby-Bauer, *JIMKI* vol. 1 no. 1, 4-5.
- Aton Yulianto, M. Kudo, T. Masuko. 2000. The Morphology and Physical Properties of Selulosa bakteri Gel. *Proceeding The Second International Workshop on Green Polymers*. Indonesia:Indonesian Polymer Association.
- Austin, 1985. *Shreve's Chemical Process Industries*. Tokyo:Mc Graw-Hill Book Co
- Averous, Luc. 2004. Biodegradable Multiphase Systems Based on Plasticized Starch : A Review. *Journal of Macromolecular Science*, United Kingdom.
- Bakri Rosidi, Arief Budhiono, Suryati, Andoyo Sugiharto, and M. Iguchi.. 2000. Production of Selulosa bakteri from Fruit Waste Materials. *Proceeding The Second International Workshop on Green Polymers*. Indonesia:Indonesian Polymer Association.

- Barud, H.S., C. A. Ribeiro, Marisa S. Crespi, M. A. U. Martines, J. Dexpert-Ghy, R. F. C. Marques, Y. Messadde1 and S. J. L. Ribeiro. 2007. Thermal Characterization of Selulosa bakteri-Phosphate Composite Membrane. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, Vol 87 (3), 815-818.
- Biemann, K, 1983, *Table of Spectral Data for Structure Determination of Organic Compounds*. Germany : Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Bhat, S.G. 1990. *Oleic Acid a Value Added Product from Palm Oil*. The Conference Chemistry Technology. PORIM. Kuala Lumpur.
- Cai, Z., Chen, P., Jin, H-J. and Kim, J., 2009, The effect of *chitosan* content on the crystallinity, thermal stability, and mechanical properties of bacterial cellulose-*chitosan* composites, *JMES*, Vol. 223, pp. 2225-2230.
- Carpenter, L.P. 1972. *Microbiology. Third Edition*. W.B. Sauders Company. Philadelphia-London-Toronto.
- Christoforus, 2010, Pembuktian Transfer Resistensi Horizontal Melalui Uji Sensitivitas Antibiotik Beta-Laktam AntarBakteri *Staphylococcus* spp. Dari Kulit Anjing yang Luka, *Laporan Penelitian*, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya
- Ciechanska, D. 2004. *Multifungsional Selulosa bakteri/Chitosan Composite Materials for Medical Applications*. *Fibres & Textiles in Eastern Europe*.

- Czaja, W.K., D.J. Young, M. Kawecki, and R. M. Brown. 2007. Reviews: The Future Prospects of Microbial Cellulose in Biomedical Applications. *Biomacromolecules*, Volume 8, No. 1., 1 – 12.
- Darmansyah. 2010. Evaluasi Sifat Fisik dan Sifat Mekanik Material Komposit Serat/Resin Berbahan Dasar Serat *Nata de Coco* dengan Penambahan Nanofilter. *Tesis*. Depok: Teknik Kimia Universitas Indonesia.
- Demse Pardosi. 2008. Pembuatan Material Selulosa Bakteri Dalam Medium Air Kelapa Melalui Penambahan Sukrosa, Kitosan dan Gliserol Menggunakan *Acetobacter Xylinum*. *Tesis*. Medan: Sekolah Pasca Sarjana Universitas Sumatra Utara.
- Dutta Kumar Pradip, Dutta Joydeep, and Tripathi S.V. (2004). Chitin and Chitosan; Chemistry, Properties and Applications. *Journal of Scientific and Industrial Reserch*. Vol 63. 20-31
- Fischer W., 1994, Lipoteichoic acid and lipids in the membrane of *Staphylococcus aureus*, *MMI*, volume 183, pp 61-67
- Fuad Ama, Achmad Arifin, Djoko Legowo . *Studi pengaruh stimulasi elektrik (es) pada Proses Percepatan Penyembuhan Luka kulit Marmut (Cavia cobaya)*. Surabaya: Jurusan Teknik Elektro ITS. Diakses dari <http://digilib.its.ac.id/public/ITS-paper-20126-Paper.pdf>,
- Francis S, Matthew JK, Howard WT. Application of chitosanbased polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials* 2000; 21(24): 2589-98.

- Goh, W.N., Rosma, A., Kaur, B., Fazilah, A., Karim, A.A. dan Bhat, R., 2012, Microstructure and physical properties of microbial cellulose produced during fermentation of black tea broth (Kombucha), *IFRJ*, vol 19(1): 153-158.
- Goosen, M.F.A. 1997. *Applications of Chitin and Chitosan*. Lansaster: Technomic Publishing Co. Inc.
- Helander I, Nurmiäho-Lassila E, Ahvenainen R, Rhoades J, Roller S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Int J Food Microbiol* 2001; 71: 235-44.
- Heru Pratomo dan Eli Rohaeti. 2010. Pembuatan Bioplastik dari Limbah Rumah Tangga sebagai Bahan *Edible Film* Ramah Lingkungan. Laporan Penelitian. Yogyakarta:UNY
- Hoenich, N. 2006. *Cellulose for Medical Applications*. Bioresources.
- Hosokawa, J., M. Nishiyama, K. Yoshihara, and T. Kubo. 1990. *Biodegradable Film Derived from Chitosan and Homogenized Cellulose*. *Ind. Eng. Chem. Res.*
- Jin, Xiaoxiao, Jiangtao Wang, Jie Bai. 2009. Synthesis and Antimicrobial Activity of the Schiff Base from Chitosan and Citral. *Carbohydrate Research*.(344). 825-829
- Katzung, B. G. 2007. *Basic & Clinical Pharmacology*, Tenth Edition. United States : Lange Medical Publications.
- Khan, A., Peh, K. and Chang, S., 2002, Reporting degree of deacytlation values of *chitosan* : the influence of analytical methods, *J. Pawn Pharmaceut. Sci.*, 5, 3.

- Kim Jaehwan, Cai Zhijiang, Lee Sook Hyun, Choi Seong Gwang, Lee Haeng Don, and Jo Chulhee. 2010. Preparation and characterization of a Bacterial cellulose/ Chitosan composite for potential biomedical application. *J Polym Res* 18:739 – 744
- Knurr D. 1982. Function properties of chitin and chitosan. *Food Science* 47: 593-595.
- Kong, M., Chen, X.G., Liu, C.S., Liu, C.G., Meng, X.H., Yu, L.J., 2008, Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against E. coli. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces* 65, 197–202.
- Kuan-Chen Cheng , J.M. Catchmark, A. Demirci. 2009. Enhanced Production of Selulosa bakteri by Using a Biofilm Reactor and its Material Properties. *Journal of Biological Engineering*, Volume 3, No.12.
- Kumar, M. N. V. R. 2000. *Review of Chitin and Chitosan Application*. Reactive Functional Polymers.
- Lisbeth Tampubolon. 2008. Pembuatan Material Selulosa-Kitosan Bakteri dalam Medium Air Kelapa dengan Penambahan Pati dan Kitosan Menggunakan *Acetobacter xylinum*. *Tesis*. USU
- Liu X, Yun L, Dong Z, Zhi L, Kang D. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *JAPS* 2001; 79(7): 1324-35. Muenduen P. dan Nirun J. 2008. Biosynthesis and Characterization of Bacterial Cellulose-Chitosan Film. *Journal Carbohydrate Polymer*, 428-488.

- Meshitsuka, G. and Isogai, A., 1996, *Chemical Structures of Cellulose, Hemicellulose and Lignin*, New York: Marcel Dekker.
- Muzzarelli, R.A.A., C. Jeuniawe, G. W. Gooday. 1986. *Chitin and Nature Technology*. New York: Plenum Press. Inc.
- Philips, G.O. and P.A. Williams. 2000. *Handbook of Hydrocolloids*. Cambridge Woodhead Publishing Ltd.
- Pillai, C. K. S., Paul, W. and Sharma, C. P., 2009, Chitin and *chitosan* polymers: Chemistry, solubility and fiber formation, *PPS*, Volume 34, Issue 7, pp. 641–678.
- Pratomo, H. dan Rohaeti, E., 2010, Pembuatan Bioplastik dari Limbah Rumah Tangga sebagai Bahan *Edible Film* Ramah Lingkungan, *Laporan Penelitian*, Yogyakarta: UNY
- Priyo Waspodo, Arief Budhiono, Suryati, dan Nathalia Sujono. 2000. *Proceeding The Second International Workshop on Green Polymers*. Indonesia: Indonesian Polymer Association.
- Rafaat D, Bargaen K, Haas A, Sahl HG. 2008. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *AEM*, 74:3764–3773.
- Rhoades, J. And B. Rastall. 1995. Chitosan as an Antimicrobial Agent. *Ingredients and Additives. Food Tech. International*.
- Saputro, A. N. C., Kartini, I., Sutarno, 2009, Pengaruh Penghilangan Tahap Deproteinasi Dalam Metode Preparasi Kitosan Terhadap Sifat Termal dan Kristalinitas Kitosan, *Prosiding*, FMIPA, UNY, Yogyakarta.

- Stefanescua, C., Dalya, W. H. and Negulescu, I. I., 2012, Biocomposite films prepared from ionic liquid solutions of *chitosan* and cellulose, *Carbohydrate Polymers*, 87, pp. 435– 443.
- Susana C. M. 2009. Novel Transparent Nanocomposite Films based on Chitosan and Bacterial Cellulose. *Green Chem*, 2023-2029.
- Thatte MR. 2004. Synthesis and antibacterial assessment of water soluble hydrophobic chittosan derivatives bearing quarternary ammonium functionality [*Dissertation*]. Los Angeles: Lousiana State University and Agricultural and Mechanical College.
- Tsai GJ, Zhang SL, Shieh PL. 2004. Antimicrobial activity of low molecular weight chitosan obtained from cellulase digestion of chitosan. *J Food Protection* 67:396-398.
- Todar K. 1997. *The Control of Microbial Growth*. Wisconsin: University of Wisconsin
- Yulina I.K., 2011, Aktivitas Antibakteri Kitosan Berdasarkan Perbedaan Derajat Deasetilasi dan Bobot Molekul, Program Pascasarjana, IPB, Bogor
- Yusmarlela. 2009. Studi Pemanfaatan Plastisiser Gliserol dalam Film Pati Ubi dengan Pengisi Serbuk Batang Ubi Kayu. *Tesis*. Medan: Sekolah Pasca Sarjana Universitas Sumatra Utara.