

FORMULASI BIOMEMBRAN KITOSAN MENGGUNAKAN MADU SEBAGAI ZAT BERKHASIAT SERTA UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI

Dwi Evryani¹⁾, Rustini¹⁾, Fitria Ramona²⁾, Muslim Suardi^{1,3)}

¹⁾Fakultas Farmasi, Universitas Andalas, Padang 25163, Sumatera Barat, Indonesia

²⁾Program Studi Ilmu Gizi, Universitas Mohammad Natsir, Bukittinggi 26136,

³⁾Program Studi Farmasi, Universitas Mohammad Natsir, Bukittinggi 26136, Sumatera Barat, Indonesia

r.ramona.881@gmail.com

Abstrak

Formulasi biomembran kitosan menggunakan madu sebagai zat berkhasiat serta uji aktivitas antibakteri telah diformulasikan dengan konsentrasi madu 5; 10; dan 15%. Kontrol positif adalah sediaan Dayrant-Tulle[®]. Madu memiliki aktivitas antibakteri dan dapat diaplikasikan dalam pembuatan biomembran sebagai zat aktif. Biomembran dibuat dengan *casting plate* menggunakan basis kitosan. Kitosan dihasilkan dari pengolahan limbah kulit udang melalui proses deproteinasi, demineralisasi, depigmentasi dan deasetilasi. Masing-masing formulasi dievaluasi berupa pemeriksaan pemerian, pemeriksaan pH, uji iritasi kulit, uji elongasi dan kekuatan regang. Uji aktivitas antibakteri biomembran kitosan terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* ditentukan secara invitro dengan metode difusi agar. Hasil uji memperlihatkan bahwa konsentrasi madu mempengaruhi daya hambat pertumbuhan bakteri ($p < 0,05$). F3 merupakan formula terbaik karena memberikan daya hambat terhadap bakteri *S. aureus* dan *P. aeruginosa* lebih baik dibandingkan F1 dan F2.

Kata Kunci: Biomembran, kitosan, antibakteri, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*

Abstract

*Biomembrane of chitosan has been formulated using honey as active ingredient at different concentrations of 5; 10; and 15%. Positive control Dayrant-Tulle[®] preparations. Honey has antibacterial activity and can be applied in formulation of biomembrane as active ingredient. The biomembrane was prepared by casting plate method using chitosan as base. Chitosan was produced from shrimp shell waste through deproteination, demineralization, depigmentation and deacetylation process. The prepared gels were characterized for their qualitative analysis, pH, skin irritation, elongation and tensile strength. Antibacterial activity of chitosan biomembrane test to *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* determined with invitro using gel diffusion method. Results showed that honey concentrate inhibitory zone against bacterial growth ($p < 0,05$). F3 was best formula of inhibitory bacterial growth of *S. aureus* and *P. aeruginosa* compare to F1 and F2.*

Key Word: Biomembrane, chitosan, antibacteria, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*

PENDAHULUAN

Membran merupakan selaput atau lembaran tipis yang berfungsi sebagai pemisah selektif dan bersifat semipermeabel. Biomembran merupakan membran dengan bahan utama yang terdiri dari biopolimer (Mulder, 1996). Biopolimer yang dimanfaatkan sebagai biomembran adalah selulosa dan turunannya. Salah satu biopolimer adalah kitosan. Kitosan adalah produk terdeasetilasi dari kitin yang merupakan polimer alami kedua terbanyak di alam

setelah selulosa, yang banyak terdapat pada serangga, Crustacea dan jamur (Sandford, 2003).

Kitosan bersifat tidak toksik, biokompatibilitas, biodegradabilitas, bioadhesif dan mudah dimodifikasi secara kimia sehingga berpotensi besar untuk diaplikasikan dalam dunia farmasi (Burkatovskaya *et al.*, 2006). Kitosan dapat larut dalam media asam encer membentuk larutan yang kental, sehingga dapat digunakan untuk pembuatan gel dalam beberapa variasi konfigurasi seperti membran (Kaban, 2009).

Kitosan merupakan padatan amorf yang berwarna putih kekuningan dengan rotasi spesifik $[\alpha]_D^{25} -3$ hingga -10° (pada konsentrasi asam asetat 2%). Kitosan larut pada kebanyakan larutan asam organik pada pH sekitar 4,0 tetapi tidak larut pada pH lebih besar dari 6,5, juga tidak larut dalam pelarut air, alkohol dan aseton. Dalam asam mineral pekat seperti HCl dan HNO₃, kitosan larut pada konsentrasi 0,15-1,1%, tetapi tidak larut dalam H₂SO₄ pada berbagai konsentrasi, sedangkan di dalam H₃PO₄ tidak larut pada konsentrasi 1% sementara pada konsentrasi 0,1% sedikit larut. Kelarutan kitosan dipengaruhi oleh bobot molekul, derajat deasetilasi dan rotasi spesifiknya yang beragam bergantung pada sumber dan metode isolasi serta transformasinya. Sifat fisika kimia tersebut sudah dijadikan bagian dalam penentuan spesifikasi kitosan niaga (Sugita, 2009).

Beberapa hasil penelitian melaporkan bahwa madu sangat efektif digunakan sebagai terapi topikal pada luka (Sumitra, Manikandan, Gayathri, & Suguna, 2009). Madu bersifat sebagai antibakteri, antioksidan dan mempunyai kandungan nutrisi yang tinggi sehingga baik digunakan dalam penyembuhan luka (Martoset al., 2008). Khasiat madu menurut (Naama, 2009) madu dipercaya memiliki efek antibakteri dan dapat mempercepat penyembuhan luka karena memiliki sifat-sifat sebagai berikut yaitu: madu mempunyai osmolaritas tinggi; pH rendah (asam); aktivitas air rendah; mengandung hidrogen peroksida; dan adanya senyawa organik bersifat antibakteri. Selain berkhasiat, madu juga memiliki antioksidan yang diperoleh dari senyawa flavonoid (Aljadi & Yusoff, 2003); (Al-Mamary, Al-Meeri, & Al-Habori, 2002), madu mengandung senyawa antiinflamasi atau dapat menghambat peradangan (Raso, Meli R Di Carlo G, 2001), madu mengandung antivirus dengan senyawa yang bertindak adalah krisin, akasetin, apigenin, kuersetin dan rutin (Amoros et al., 1992), madu sebagai sumber nutrisi dengan kandungan glukosa, fruktosa, maltosa, sukrosa, karbohidrat, enzim diatase, enzim invertase. Kandungan glukosa yang tinggi dalam madu berkhasiat untuk mengembalikan cairan tubuh dengan cepat (Mangan, 2008), madu memperbaiki dan melindungi sistem pencernaan karena mampu menghambat bakteri yang merugikan seperti *Helicobacter pylori* yang menyebabkan tukak lambung (Jaffari, 2006).

Menurut (Suranto, 2004), madu dapat digolongkan berdasarkan jenis tanaman yang menjadi sumber nektarnya, yaitu madu monofloral dan polifloral. Madu monofloral adalah madu yang dihasilkan dari satu jenis bunga misalnya madu lengkung dan madu rambutan. Madu yang dihasilkan dari sari buah yang dikumpulkan lebah dari banyak bunga disebut madu polifloral yang lebih banyak dihasilkan oleh lebah liar. Kualitas madu ditentukan oleh cara panen madu, warna madu, citarasa madu, jenis madu, komposisi madu dan kadar air madu.

Penelitian terhadap pengujian aktivitas antibakteri madu telah beberapa kali dilakukan diantaranya penelitian aktivitas antibakteri madu hutan Ciburial, Bandung dengan konsentrasi 5; 10; dan 15% yang menunjukkan diameter zona hambatan berturut-turut 22,80; 26,90; 28,80; 28,70 mm (Wasito, et al., 2008). Pengujian aktivitas antibakteri madu Basrah, Iraq memperlihatkan hasil diameter hambatan madu pada konsentrasi madu 250; 75; 100% v/v berturut-turut 0; 0; 11; 20 mm terhadap bakteri *S. aureus* dan 0; 8; 10; 23 mm terhadap bakteri *P. aeruginosa* (Naama, 2009). Aktivitas antibakteri madu Nigeria Barat dengan konsentrasi 20; 40; 60; 100% (w/v) memiliki daerah hambatan berturut-turut sebesar 4,80; 7,90; 11,40; 11,60 mm terhadap bakteri *S. aureus* dan 0; 0; 4,10; 5,30; 5,80 mm terhadap bakteri *P. aeruginosa* (Agbagwa & Peterside, 2010).

Perbedaan sifat antibakteri pada madu tergantung sumber, masa penyimpanan serta pengolahannya. Pertumbuhan vegetatif bunga pada musim tertentu juga mempengaruhi produksi zat antimikroba pada madu alam (Mulu, Tessema, & Derby, 2004).

METODE PENELITIAN

Pengujian aktivitas antibakteri membran kitosa dilakukan dengan menggunakan metode difusi agar. Bakteri uji yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Kekuatan daya antibakteri membran kitosan ditentukan dengan mengukur diameter daerah hambatan yang ditandai dengan terbentuknya daerah bening disekitar membran.

Sampel

Sampel kulit udang yang digunakan untuk pembuatan kitosan adalah *Penaeus merguensis* de Man yang telah diidentifikasi di Laboratorium Ekologi Perairan Biologi Fakultas MIPA Universitas Andalas. Madu yang digunakan dalam pembuatan membran adalah madu yang diperoleh dari pengrajin dan telah diidentifikasi di Laboratorium Analisis dan Kalibrasi Balai Besar Industri Agro Bogor.

Pembuatan Membran Kitosan

Kulit udang yang telah dibersihkan dan dikeringkan di bawah sinar matahari, dideproteinasi dengan NaOH 3,5% (1:10) dengan suhu 65°C. Residu kemudian dinetralkan dan dikeringkan di bawah sinar matahari. Kemudian dilakukan demineralisasi dengan larutan HCl 1 N (1:10), dinetralkan dan dikeringkan sehingga didapatkan kitin kasar. Kitin tersebut direndam dengan aseton (1:10) selama 4 jam dan diputihkan dengan Natrium Hipoklorit encer (NaClO) 0,5%, dinetralkan dan dikeringkan. Kitin kemudian dideasetilasi dengan NaOH 60% (1:20) dan dipanaskan pada suhu 100°C, dicuci, dinetralkan dan dikeringkan sehingga dihasilkan kitosan.

Pemeriksaan Bahan Baku

Pemeriksaan madu berdasarkan Badan Standarisasi Nasional (2004) yaitu: penentuan kadar air madu dengan mencari nilai indeks bias madu menggunakan alat refraktometer; pengujian keasaman dengan 75 mL larutan aquadest ditambahkan 4-5 tetes indikator PP, dititrasasi dengan NaOH 0,1 N sampai warna merah muda; penentuan hidroksimetilfulfural (HMF) dengan 25 mL aquadest ditambahkan 0,50 mL pereaksi Carrez I dikocok, ditambahkan 0,50 Carrez II dikocok dan diencerkan dengan aquadest, dan ditambahkan Na.Bisulfit 0,2% dikocok menggunakan Vortex mixer sampai tercampur sempurna.

Pemeriksaan kitosan meliputi: pemerian (Fahmi, 2010) yaitu pemeriksaan bentuk, warna dan bau; penentuan susut pengeringan (Depkes RI, 1979); pemeriksaan kadar abu (Depkes RI, 1979); uji bebas protein (Sumardadji, 1997); penentuan derajat deasetilasi (Sabnis & Block, 1997); penetapan kadar Ca²⁺ dan Mg²⁺ (Khopkar, 2010) dilakukan dengan menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA); pemeriksaan asam laktat (Sweetman, 2009); pemeriksaan gliserol (Depkes RI, 1995) dan pemeriksaan polivinil alkohol (Depkes RI, 1995).

Pembuatan membran dengan menggunakan metoda modifikasi *casting*. Formulasi membran dapat dilihat pada tabel 1. Pada *beaker glass* I sebanyak 0,08 gram kitosan dilarutkan dengan 2 mL asam laktat 2% sampai terbentuk massa yang homogen menggunakan *magnetic stirrer* selama 4 jam. Pada *beaker glass* II 0,5 g PVA ditambahkan 4 gram air suling, dipanaskan, diaduk sampai bening dan homogen. Larutan kitosan dan massa PVA dicampurkan, ditambah gliserol, madu dan aquadest sampai bobot 10 g dan diaduk hingga homogen. Setelah dilakukan pengukuran pH, dituangkan ke dalam cawan petri dan dibiarkan mengering selama tiga hari pada suhu kamar di atas permukaan yang rata.

Tabel 1. Formulasi Membran

No	Nama Zat (g)	F1	F2	F3	F4
1.	Kitosan	0,08	0,08	0,08	0,08
2.	Madu	0,5	1	1,5	-
3.	Gliserol	0,4	0,4	0,4	0,4

HASIL PENELITIAN

Pemeriksaan kitosan telah memenuhi persyaratan standar Hand Book of Pharmaceutical Excipient meliputi pemerian, susut pengeringan, kelarutan, kadar abu, Derajat Deasetilasi (DD), uji bebas protein, kadar Ca²⁺ dan Mg²⁺ dapat dilihat pada Tabel 2.

4.	Polivinil Alkohol	0,5	0,5	0,5	0,5
5.	Aquadest ad	10	10	10	10

Evaluasi membran yang dilakukan adalah pemeriksaan pemerian (Depkes RI, 1995) atau pengamatan terhadap bentuk, warna dan bau secara visual; pemeriksaan pH (Martin *et. al*, 1993); uji iritasi kulit (Wasitaatmadja, 1997); uji elongasi dan kekuatan regang membran dengan menggunakan alat Universal Testing Machine Zwick® DO-FBO.5T5.

Pengujian Aktivitas Antibakteri Membran Kitosan

Pembuatan media bakteri uji diawali dengan melarutkan 20 g serbuk Nutrient Agar dalam 1 liter aquadest, dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk sempurna. Kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 15 lbs selama 15 menit. Bakteri uji dari stok murni ditanam pada agar miring dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37 °C. Untuk persiapan suspensi bakteri uji, bakteri diambil dari agar miring, disuspensikan ke dalam aquadest steril, divorteks sampai homogen, ukur kekeruhan suspensi dengan spektrofotometer UV hingga diperoleh suspensi dengan transmittan 25% pada panjang gelombang 580 nm.

Dalam proses penyiapan suspensi bakteri uji, bakteri dari agar miring NA disuspensi ke dalam aquadest steril, divorteks sampai homogen, kemudian diukur kekeruhan suspensi dengan spektrofotometer UV hingga diperoleh suspensi dengan transmittan 25% pada panjang gelombang 580 nm. Untuk penentuan aktivitas bakteri sebanyak 0,1 mL suspensi bakteri ditambah 12 mL media NA dan dihomogenkan. Membran dipotong seperti cakram dan diletakkan di media padat. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 39°C dan diamati pertumbuhan bakteri serta diukur diameter daerah hambat yang ditandai dengan timbulnya daerah bening di sekitar cakram.

Analisis Data

Pengolahan data dilakukan dengan ANOVA satu arah menggunakan *software* SPSS 17.0 (*Statistical and Service Solution*).

Tabel 2. Hasil Pemeriksaan Serbuk Kitosan

No	Identifikasi	Pengamatan	Persyaratan (Rowe, 2009)
1.	Pemerian	Serbuk, berwarna putih kekuningan, tidak berbau dan tidak berasa.	Serbuk granul, warna putih hampir kuning, tidak berbau dan tidak berasa.
2.	Susut pengeringan	2,011%	Tidak lebih dari 10%
3.	Kelarutan kitosan	Tidak larut dalam air, sangat sukar larut dalam etanol, arut dalam asam asetat dan asam laktat	Praktis tidak larut dalam air, sangat sukar larut dalam alkohol, larut dalam asam asetat dan asam laktat
4.	Kadar abu	0,0497%	Tidak lebih dari 2%
5.	Derajat deasetilasi	73,56%	Lebih dari 70%
6.	Uji bebas protein	Tidak terbentuk warna ungu pada kitosan	Tidak terbentuk warna ungu pada kitosan
7.	Logam magnesium	37,7 ppm	≤40 ppm
8.	Logam kalsium	29,5 ppm	≤40 ppm

Evaluasi membran meliputi pemeriksaan pemerian membran; dengan semua bentuk padat transparan, warna kekuningan dan bau madu. Pemeriksaan pH sebelum dan sesudah dicetak (24 jam) dapat dilihat pada Tabel 3.

Pemeriksaan uji iritasi kulit menunjukkan tidak adanya iritasi dan pemeriksaan elongasi dan kekuatan regang, menunjukkan jumlah larutan madu tidak mempengaruhi secara nyata terhadap elongasi dan kekuatan regang.

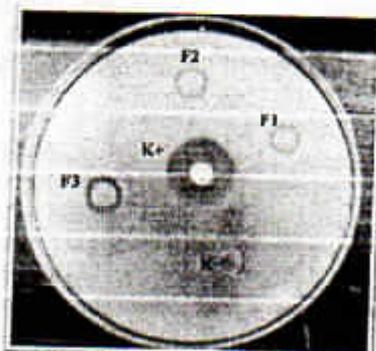
Tabel 3. Hasil Pemeriksaan PH Sebelum dan Setelah Dicetak (24 Jam)

Formula	Rata-rata Sebelum Dicetak	Rata-rata Setelah Dicetak (24 Jam)
F1	4,67±0,02	4,75±0,04
F2	4,63±0,03	4,63±0,04
F3	4,56±0,02	4,52±0,02
F4	4,86±0,01	4,96±0,03

Uji Aktivitas Antibakteri

Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus* dan *P. aeruginosa* menunjukkan jumlah larutan madu

mempengaruhi secara nyata ($p < 0,05$) terhadap diameter hambat 8,25-11 mm.



Gambar 1. Hasil uji daerah hambat membran kitosan terhadap bakteri *S. aureus*

Ket :
K⁺ = Kontrol Positif (Daryant-Tulle®)

K⁻ = Kontrol Negatif (Tanpa menggunakan madu)
F1 = Formula 1
F2 = Formula 2
F3 = Formula 3



Gambar 2. Hasil uji daerah hambat membran kitosan terhadap bakteri *P. aeruginosa*

Ket :

K⁺ = Kontrol Positif (Daryant-Tulle®)

K⁻ = Kontrol Negatif (Tanpa menggunakan madu)
 F1 = Formula 1
 F2 = Formula 2
 F3 = Formula 3

PEMBAHASAN

Pada umumnya kitosan yang terdapat dalam cangkang udang terikat dengan gugus protein, mineral, pigmen warna dan gugus asetil sehingga untuk mendapatkan kitosan murni perlu dilakukan 4 tahap (Fahmi, 2010); (Fernandez-Kim, 2004). Tahap pertama adalah deproteinasi menggunakan NaOH 3,5% pada suhu 65°C selama 2 jam untuk menghidrolisis protein dalam jaringan, residu bebas protein yang diperoleh sebanyak 65g dari 100 g kulit udang kering. Tahap kedua yaitu demineralisasi menggunakan HCl 1 N pada suhu kamar selama 1 jam supaya ion-ion logam membentuk garam klorida yang mudah larut dalam air, residu yang diperoleh 24,5 g. Pada tahap ketiga, depigmentasi menggunakan menggunakan Natrium Hipoklorit (NaClO 0,5%) untuk mengoksidasi pigmen, residu yang diperoleh 23,3 g. Tahap terakhir adalah deasetilasi menggunakan NaOH 60% pada suhu 100°C selama 1 jam untuk memutuskan gugus asetil sehingga diperoleh kitosan dengan residu 13,2 g.

Kitosan yang diperoleh selanjutnya dievaluasi untuk menjamin kualitasnya. Pada pemeriksaan pemerian, kitosan berbentuk serbuk, berwarna putih kekuningan, tidak berbau dan tidak berasa. Pada pemeriksaan susut pengeringan, diperoleh 2,011%. Penentuan susut pengeringan bertujuan untuk mengetahui seberapa besar kadar air yang terdapat di dalam kitosan. Hal ini merupakan satu parameter penting untuk menentukan mutu kitosan. Jumlah kadar air yang terkandung di dalam kitosan dipengaruhi oleh proses pengeringan, lama pengeringan, jumlah kitosan yang dikeringkan dan luas permukaan tempat kitosan dikeringkan (Saleh *et. al.*, 1994). Pada pemeriksaan kelarutan, kitosan tidak larut dalam air, sangat sukar larut dalam etanol, larut dalam asam asetat dan asam laktat. Pada pemeriksaan kadar

abu, diperoleh 0,0497% kadar abu. Pengukuran kadar abu bertujuan untuk mengetahui banyaknya kadar senyawa organik yang terdapat di dalam kitosan. Semakin rendah kadar abu yang dihasilkan maka mutu dan tingkat kemurnian kitosan akan semakin tinggi. Pada pengukuran Derajat Deasetilasi (DD) kitosan, diperoleh 73,56%. DD menunjukkan persentase gugus asetil yang dapat dihilangkan dari kitin sehingga dihasilkan kitosan DD yang tinggi menunjukkan bahwa gugus asetil yang terkandung dalam kitosan adalah rendah. DD kitosan dapat ditentukan berdasarkan spektrum IR dengan metode *base line* (Khan & Peh, 2000). Pada pemeriksaan kandungan Ca²⁺ dan Mg²⁺ yang dilakukan dengan menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom didapatkan kadar logam Ca²⁺ 29,5 ppm yang diperoleh dari persamaan linear kurva kalibrasi logam Mg²⁺ sebesar 37,7 ppm yang diperoleh dari persamaan linear $Y = 0,061x - 0,006$.

Semua pemeriksaan karakteristik kitosan di atas telah memenuhi standar mutu kitosan yang dikeluarkan oleh Protan Laboratories Inc, yang menyatakan bahwa pemerian kitosan adalah serbuk granul, warna putih-hampir kuning, tidak berbau dan tidak berasa, praktis tidak larut dalam air, sangat sukar larut dalam alkohol, larut dalam asam asetat, mempunyai kadar abu tidak boleh lebih dari 2%, susut pengeringan tidak boleh lebih dari 10%, DD harus lebih dari 70% dan kadar Ca²⁺ dan Mg²⁺ tidak boleh lebih dari 40 ppm.

Pemeriksaan madu yang dilakukan yaitu penentuan kadar air, pengujian keasaman, penentuan Hidroksimetilsulfurformal (HMF). Penentuan kadar air pada madu perlu dilakukan karena merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi mutu madu. Madu yang

mempunyai kadar air yang tinggi akan mudah berfermentasi karena adanya aktivitas mikroorganisme atau ragi. Akibatnya madu mengalami perubahan rasa dan menurunkan keawetan madu. Kandungan air dalam madu dapat diukur dengan refraktometer atau dengan hydrometer yang dilengkapi dengan termometer (Sumoprastowo & Suprpto, 1993). Kadar air madu pada penelitian ini diukur dengan refraktometer. Dari hasil pemeriksaan diperoleh kadar air madu 21,0% b/b. Perbedaan kadar air pada madu disebabkan oleh keragaman sumber nektar dan wilayah geografis tempat madu tersebut dihasilkan. Pemeriksaan keasaman madu dilakukan untuk mengetahui kualitas madu. Kandungan asam yang tinggi akan merangsang terjadinya fermentasi oleh bakteri maupun mikroba lain (Budiwijono, 2003).

Pemeriksaan keasaman madu memenuhi persyaratan dimana SNI 01-3545-2004 menyatakan bahwa keasaman madu maksimal 50 mL N NaOH/Kg sedangkan hasil pengamatan adalah 40,3 mL N NaOH/Kg. Keasaman madu ditentukan oleh disosiasi ion hidrogen dalam larutan air, namun sebagian ditentukan juga oleh kandungan beberapa mineral seperti Na, Ca dan K (Sihombing, 1997). Pengujian HMF dalam madu sangat penting dalam menentukan kualitas madu. Kadar HMF merupakan salah satu indikator kerusakan madu oleh pemanasan yang berlebihan maupun karena pemalsuan dengan gula (Maun, 1999). Hasil pemeriksaan HMF didapat adalah 0 mg/Kg, hasil ini memenuhi persyaratan SNI 01-3545-2004 dan menunjukkan bahwa madu yang digunakan memiliki mutu yang baik.

Membran dibuat menggunakan kitosan sebagai bahan dasar. Struktur kitosan yang sangat rapuh tidak bisa langsung digunakan. Untuk mengatasinya perlu ditambahkan zat aditif yang memperbaiki sifat-sifat membran. Modifikasi membran kitosan diharapkan dapat menghasilkan membran dengan karakter yang lebih baik, misalnya peningkatan kestabilan dan sifat mekanik membran (Jin *et al.*, 2004). Pada penelitian ini aditif yang digunakan adalah polivinil alkohol (PVA) dan gliserol, sedangkan untuk zat berkhasiat digunakan madu. Kitosan yang telah diisolasi digunakan sebagai bahan dasar pembuat kitosan dapat membentuk gel dalam suasana asam seperti asam laktat, asam asetat, asam formiat, asam maleat dan asam askorbat. Pada penelitian ini digunakan asam laktat karena kitosan lebih mudah larut di dalam asam laktat dibandingkan asam lainnya.

Asam laktat memiliki bau yang tidak menyengat (Rowe, 2009). Penggunaan asam laktat juga tidak menimbulkan reaksi alergi, membran yang dihasilkan lebih fleksibel, bioadhesif, lebih lembut dan baik digunakan untuk pembalut luka (Khan & Peh, 2000). Konsentrasi kitosan yang digunakan adalah 4% dalam asam laktat 2%. Menurut peneliti sebelumnya, kitosan 4% yang

dilarutkan dalam asam laktat 2% menghasilkan massa yang kental dan dapat diputar dengan *magnetic stirrer* sedangkan konsentrasi kitosan di bawah 4% menghasilkan massa yang lebih encer, dan konsentrasi di atas 4% menghasilkan massa yang terlalu kental sehingga tidak dapat diputar dengan *magnetic stirrer* (Restinia, 2010). Setelah larutan kitosan 4% dalam asam laktat 2% distirrer selama 6 jam, diambil sebanyak 20% larutan kitosan untuk pembuatan membran. Peneliti Restinia (2010), menemukan bahwa jumlah larutan kitosan 20, 25, 30, 35 dan 40% dalam pembuatan membran menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ($p > 0,05$) terhadap sifat fisik membran yaitu kekuatan regang dan sifat elongasi.

PVA dapat digunakan sebagai peningkat viskositas dan dapat membentuk lapisan film elastis, sehingga membran yang terbentuk dapat diangkat dengan mudah tanpa retak atau robek (Wade & Weller, 1994). Meriatna (2008), menyatakan bahwa membran kitosan memiliki ketahanan sobek yang rendah sehingga untuk kegunaan tertentu sering ditambahkan polimer penguat seperti PVA, PVC, polyester dan N-metilol nilon. Konsentrasi PVA digunakan adalah 5%. Berdasarkan penelitian Restinia (2010), konsentrasi PVA yang dapat membentuk membran kitosan yang baik adalah 5%, karena konsentrasi di bawah 5%, membran yang dihasilkan masih rapuh dan sobek waktu diangkat dari cetakan (cawan petri).

Gliserol digunakan secara luas dalam formulasi obat seperti sediaan oral, ophthalmik, topikal dan parental. Di samping kegunaannya sebagai humektan dan emolien, gliserol di dalam pembuatan membran ini digunakan sebagai plasticizer yaitu pembentuk plastik, yang juga dapat meningkatkan kualitas membran. (Eldin, *et al.*, 2008) menggunakan gliserol 4% dalam membuat membran modifikasi kitosan yang ditambah dengan gliserol menghasilkan kekuatan dan elongasi membran yang lebih baik.

Madu merupakan salah satu obat tradisional yang terbukti mengandung zat yang aktif melawan bakteri. Madu dapat mempercepat perawatan luka dengan jaringan parut yang minimal, sangat efektif pada pengelupasan kulit yang menebal dan mampu meningkatkan fibroblas yang berperan dalam penyembuhan luka (Pardjianto *et al.*, 2007).

Kemampuan madu sebagai antioksidan diteliti dengan menggunakan metode elektrokimia yang menunjukkan kemampuan bahan dalam mereduksi radikal bebas. Selain itu madu juga memiliki sifat antibakteri karena adanya senyawa flavonoid seperti pinosembrin, pinobangsin dan krisin (Aljadi & Yusoff, 2003). Adanya senyawa hidrogen peroksida juga diyakini sebagai

antibakteri utama pada madu. Sifat antibakteri pada madu yang memiliki pH rendah, osmolaritas tinggi dan aktivitas air yang rendah (Cooper, Molan, & Harding, 1999).

Konsentrasi madu yang digunakan 5; 10; dan 15% (w/w). Konsentrasi madu dimulai dari 5% karena pada uji pendahuluan diperoleh konsentrasi terendah dari madu yang dapat memberikan diameter daerah hambat pertumbuhan bakteri adalah 5%. Konsentrasi madu dibuat bervariasi bertujuan untuk melihat pengaruh jumlah penambahan larutan madu terhadap daya hambat pertumbuhan bakteri pada membran.

Pembuatan membran dilakukan menggunakan metoda casting plate dimana massa membran yang telah tercampur homogen dituang ke dalam cawan petri, dibiarkan mengering selama 3 hari, kemudian dilepaskan. Setelah membran terbentuk, dilakukan evaluasi membran yaitu pemeriksaan pemerian, pH, uji iritasi kulit dan uji aktivitas antibakteri. Pemeriksaan pemerian dilakukan secara visual (Carter, 1975). Membran yang dihasilkan berbentuk padat, transparan, berbau madu dan berwarna kekuningan.

Pemeriksaan pH menggunakan pH meter dilakukan sebelum membran dicetak dan setelah terbentuk membran (didiamkan selama 24 jam). Pemeriksaan pH sebelum membran dicetak pada formula I, II, III dan IV adalah $4,67 \pm 0,02$, $4,63 \pm 0,03$, $4,56 \pm 0,02$, $4,86 \pm 0,01$. Hasil uji lanjut Duncan formula II dan formula III tidak, tetapi formula I dan IV, berbeda nyata ($p < 0,05$). Pemeriksaan pH membran setelah 24 jam pada formula I, II, III adalah $4,750 \pm 0,04$, $4,636 \pm 0,04$, $4,529 \pm 0,02$, $4,96 \pm 0,03$. Hasil uji lanjut Duncan formula I, II, III dan IV berbeda nyata ($p < 0,05$). Pemeriksaan pH bertujuan untuk melihat perubahan pH apakah sesuai untuk pemakaian pada kulit. Hasil pemeriksaan pH masih dalam rentang pH kulit normal (4,2 – 6,5) sehingga sediaan sesuai untuk pemakaian pada kulit dan tidak menyebabkan iritasi kulit. Pada pemeriksaan pH dapat diketahui bahwa membran tanpa menggunakan madu mempunyai pH yang lebih tinggi (basa) hal ini disebabkan karena madu yang mempunyai sifat asam (pH rendah) dan kitosan mempunyai sifat basa.

Pemeriksaan uji iritasi kulit sediaan dilakukan pada 5 panelis dengan uji tempel tertutup dan membran ditempelkan langsung pada tangan manusia bagian atas sebelah dalam selama 24 jam. Hasil pemeriksaan menunjukkan tidak adanya timbul kemerahan dan gatal-gatal berarti tidak terjadi reaksi iritasi.

Uji elongasi dan kekuatan rengang merupakan karakteristik sifat mekanik yang perlu dilakukan untuk mengetahui kekuatan membran terhadap gaya yang berasal dari luar yang dapat merusak membran. Semakin

rapat struktur membran, berarti jarak antar molekul dalam membran semakin rapat sehingga mempengaruhi kekuatan tarik yang kuat. Pengujian dilakukan menggunakan alat Testing Machine Zwick®. Dengan ini dilihat kemampuan membran untuk diregangkan ketika diberi gaya tertentu sehingga diketahui perbandingan elongasi membran pada saat gaya yang diberikan maksimum. Pengaruh jumlah larutan madu terhadap elongasi membran terhadap elongasi dan kekuatan rengang membran menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ($p > 0,05$). Sehingga dapat disimpulkan jumlah larutan madu tidak mempengaruhi secara nyata terhadap kekuatan rengang membran.

Pengujian aktivitas antibakteri membran kitosan dilakukan menggunakan metode difusi agar. Metode difusi agar merupakan teknik yang paling sering digunakan untuk menentukan aktivitas antibakteri. Metode difusi dilakukan dengan cara menambahkan suspensi bakteri ke dalam media agar padat yang sesuai selanjutnya diletakkan membran yang telah dicetak berbentuk cakram menggunakan bantuan pelobang kertas kemudian diinkubasi pada suhu $36-37^{\circ}\text{C}$ selama 18-24 jam. Aktivitas antibakteri berkorelasi dengan diameter zona hambat. Aktivitas antibakteri dikatakan lemah jika memiliki diameter daerah hambatan 7-11 mm, aktivitas sedang memiliki daerah hambatan 12-16 mm, sedangkan aktivitas kuat jika daerah hambatan > 17 mm (Jawetz, E. Melnick & J., Adelberg, 2008). Aktivitas antibakteri dilihat dengan mengukur daerah di sekitar membran yang tidak ditumbuhi bakteri. Makin besar diameter hambatan pertumbuhan tersebut berarti aktivitas antibakteri bahan yang diuji semakin kuat (Rahalison *et al* 1991).

Bakteri yang digunakan dalam penelitian adalah *S. aureus* untuk mewakili bakteri gram positif dan *P. aeruginosa* untuk mewakili bakteri gram negatif. Bakteri kelompok Staphylococcus merupakan bakteri gram positif yang dapat menyebabkan berbagai penyakit. Lebih dari 30 jenis Staphylococcus yang dapat menginfeksi manusia dan dari jenis tersebut yang paling banyak menginfeksi adalah *S. aureus*. Bakteri *S. aureus* dapat mengakibatkan infeksi pada kulit atau luka pada organ tubuh (Stroppler, 2008). Bakteri *P. aeruginosa* sering ditemukan pada kulit manusia yang terinfeksi berupa luka bermanah berwarna kuning sampai kuning kehijauan (Jawetz *et al*, 2008).

Dari pengujian yang dilakukan terlihat bahwa membran kitosan dengan penambahan madu sebagai zat berkhasiat memberikan daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *P. aeruginosa* yang dapat dilihat dari terbentuknya daerah bening pada medium agar. Pengujian aktivitas antibakteri yang dilakukan memberikan diameter hambat pada membran kitosan yang ditambahkan madu dengan konsentrasi 5; 10; dan

15% yang ditunjukkan oleh diameter daerah hambat berturut-turut 8,90; 9,60; 10,14 mm terhadap bakteri *S. aureus* dan 9,42; 9,96; 10,94 mm terhadap bakteri *P. aeruginosa*. Dari pengujian daya hambat membran kitosan menggunakan madu sebagai zat berkhasiat aktivitas antimikroba tergolong lemah.

Dari hasil uji aktivitas antibakteri dapat diketahui bahwa membran kitosan saja tanpa menggunakan madu juga memberikan daya hambat sebesar 7,75 mm terhadap bakteri *S. aureus* dan 8,70 mm terhadap bakteri *P. aeruginosa*. Hal ini disebabkan karena kitosan mempunyai gugus amin yang menghasilkan efek antibakteri lemah (Eldin *et al.*, 2008). Aktivitas antibakteri membran kitosan saja menunjukkan hasil berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan aktivitas antibakteri membran kitosan dengan penambahan madu sehingga dapat diketahui bahwa pada pengujian aktivitas antibakteri membran kitosa, aktivitas antibakteri madu lebih besar dari aktivitas antibakteri kitosan.

Dari hasil pengukuran diameter daerah hambat pertumbuhan bakteri membran kitosan diperoleh data diameter daerah hambatan pertumbuhan bakteri. Data diolah dengan analisis Anova satu arah. Dari hasil pengolahan data dapat dilihat bahwa perlakuan yang diberikan menunjukkan nilai signifikan 0,00 ($p < 0,05$).

DAFTAR PUSTAKA

- Agbagwa, O. E., & Peterside, N. F. (2010). Effect of raw commercial honeys from Nigeria on selected pathogenic bacteria. *African Journal of ...*, 4(16), 1801–1803. Retrieved from <http://www.academicjournals.org/journal/AJMR/article-full-text-pdf/FC4E75614187>
- Aljadi, A. M., & Yusoff, K. M. (2003). Isolation and Identification of Phenolic Acids in Malaysian Honey with Antibacterial Properties, 33, 229–236.
- Al-Mamary, M., Al-Meeri, A., & Al-Habori, M. (2002). Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research*, 22(9), 1041–1047. [http://doi.org/10.1016/S0271-5317\(02\)00406-2](http://doi.org/10.1016/S0271-5317(02)00406-2)
- Amoros, M., Sauvager, F., Girre, L., Cormier, M., Amoros, M., Sauvager, F., ... In, M. C. (1992). In vitro antiviral activity of propolis To cite this version :, 23(3), 231–240.
- Block, S. S. L. H. (1997). Improved infrared spectroscopic method for the analysis of degree of N-deacetylation of chitosan. *Polymer Bulletin*, 39, 67–71. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/s002890050121>
- Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan yang diberikan dengan variasi peningkatan jumlah madu berpengaruh terhadap diameter daerah hambatan bakteri dan menghasilkan efek yang berbeda nyata sehingga pengolahan data dilanjutkan dengan metoda uji lanjut Duncan yang berguna untuk menunjukkan hasil yang lebih bermakna. Dari hasil uji lanjut Duncan terlihat bahwa membran kitosan yang mengandung larutan madu 5; 10; 15% (w/w) menunjukkan diameter hambat yang berbeda nyata. Secara keseluruhan F3 merupakan formula terbaik karena memberikan daya hambat terhadap bakteri *S. aureus* dan *P. aeruginosa* lebih baik dibandingkan F1 dan F2.

SIMPULAN

Kitosan yang diperoleh dari hasil pengolahan limbah udang mempunyai rendemen 13,20% dengan derajat deasetilasi 72,93%. Membran kitosan dengan menggunakan madu sebagai zat berkhasiat mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *P. aeruginosa*. Penambahan jumlah larutan madu dengan konsentrasi 5; 10; 15% memberikan pengaruh terhadap diameter daerah hambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *P. aeruginosa* ($p < 0,05$). Dari kelima formula yang diformulasi, F3 (penambahan madu dengan konsentrasi 5%) menunjukkan hasil yang paling baik untuk memberikan daya hambat.

Budiwijono, T. (2003). *Evaluasi gula pereduksi, enzim dan hidroksi metil furfural pada madu lebah apis cerana dan apis mellifera dari berbagai tanaman sumber nektar pada peternakan rakyat tradisional di kabupaten pasuruan dan malang*. Universitas Muhammadiyah Malang.

Burkatovskaya, M., Tegos, G. P., Swietlik, E., Demidova, T. N., Castano, A. P., & Hamblin, M. R. (2006). Use of chitosan bandage to prevent fatal infections developing from highly contaminated wounds in mice, 27, 4157–4164.

Carter, S. (1975). *Dispensing for pharmaceutical student* (12th ed.). London: Pitman Medica.

Complete, T., & Reference, D. (n.d.). No Title.

Cooper, R. A., Molan, P. C., & Harding, K. G. (1999). Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* from infected wounds. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 92(6), 283–5. <http://doi.org/10.1177/014107689909200604>

Fahmi, R. (2010). Isolasi dan Transformasi Kitin menjadi Kitosan. *Jurnal Kimia Unand*, 1 (3).

Fernandez-Kim, S. (2004). Physicochemical and

- Functional Properties of Crawfish Chitosan As Affected By Different Processing Protocols, (December).
- G Raso, Meli R Di Carlo G, P. M. D. C. (2001). Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. *Life Sciences*, 68(8), 921-931.
- Hendri Wasito, Sani Ega Priani, dan Y. L. (2008). Uji Aktivitas Antibakteri Madu terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*. *LPPM Unisba*.
- Hourston, J. J.; M. S. & D. (2004). Novel chitosan-based film cross-linking by genipin with improved physical properties. *Biomacromol*, 5, 165-168.
- Indonesia, S. N., & Nasional, B. S. (2004). Sni 01-3545-2004.
- Jawetz, E., Melnick, J., Adelberg, E. (2008). *Mikrobiologi Kedokteran* (12th ed.). Jakarta: EGC.
- Kaban, J. (2009). *Modifikasi Kimia dari Kitosan dan Aplikasi Produk yang dihasilkan*. Universitas Sumatera Utara.
- Khopkar, S. (2010). *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press.
- M Saleh; Abdilla, R., Suherman; M., Basmal, J. dan, & Indriati, N. (1994). Pengaruh suhu, waktu dan konsentrasi pelarut pada ekstraksi kitosan dari limbah pengolahan udang beku terhadap beberapa parameter mutu kitosan. *Jurnal Pasca Panen Perikanan*, 81.
- M.Hidayat, B. P.; B.; R.; H.; Y.; (2007). Penggunaan madu sebagai primary dressing pada luka insisi steril dalam upaya pencegahan parut hipertrofik dan keloid. *Jurnal Ilmu Bedah Indonesia (Indonesian Journal of Surgery)*, 2 (34).
- Mangan, Y. (2008). *Cara Bijak Menaklukkan Kanker*. Agromedia Pustaka.
- Martin, Alfred; Swarbrick, J & Cammarata, A. (1993). *Farmasi fisik : dasar-dasar kimia fisik dalam ilmu farmasetik* (3rd ed.). Jakarta: UI Press.
- Maun, S. (n.d.). Pemalsuan madu dengan sakarosa.
- Meriatna. (2008). *Penggunaan membran kitosan untuk menurunkan kadar logam Krom (Cr) dan Nikel (Ni) dalam limbah cair industri pelapisan logam*. Universitas Sumatera Utara.
- Mohy Eldin, M. S., Soliman, E. A., Hashem, A. I., & Tamer, T. M. (2008). Chitosan modified membranes for wound dressing applications: Preparations, characterization and Bio-evaluatio *Trends in Biomaterials and Artificial Orga* 22(3), 158-168.
- Mulder, M. (1996). *Basic Principles of Membra Technology* (2nd ed.). Kluwer Academic Publish
- Mulu, A., Tessema, B., & Derbie, F. (2004). In Vit Assessment of the Antimicrobial Potential Honey against Enteric Pathogens. *Ethiop.J.Heal Dev*, 18(2), 107-111
<http://doi.org/10.4314/ejhd.v18i2.9945>
- Naama, R. T. A.-. (2009). Evaluation of in-vitro inhibitory effect of honey on some microbio isolate, 1(6), 64-67.
- Peh, T. A. K. K. K. (2000). *Influence of chitosa molecular weight on its physycal properties*. University of Science Malaysia.
- Rahalison, L., Hamburger, M., Hostettmann, K., Monod M., & Frenk, E. (1991). A bioautographic aga overlay method for the detection of antifunga compounds from higher plants. *Phytochemical Analysis*, 2(5), 199-203
<http://doi.org/10.1002/pca.2800020503>
- Restinia, M. (2010). *Pengaruh kitosan terhadap sifut elongasi dan kekuatan regang biomembran penutup luka*. Universitas Andalas.
- Reviews, C., & Science, F. (2008). Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly, 73(9), 117-124.
<http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00966.x>
- RI, D. (1979). *Farmakope Indonesia* (3rd ed.). Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- RI, D. (1995). *Farmakope Indonesia* (4th ed.). Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Rowe, R. C. (2009). *Hand Book of Pharmaceutical Excipient* (6th ed.). London: Pharmaceutical Press.
- Sihombing, D. T. H. (1997). *Ilmu Ternak Lebah Madu*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.
- Sugita, P. (2009). *Kitosan: Sumber Biomaterial Masa Depan*. IPB Press.
- Suhardi, S. S. B. H. (1997). *Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian* (4th ed.). Yogyakarta: Liberty.
- Sumitra, M., Manikandan, P., Gayathri, V. S., & Suguna, L. (2009). Influence of Honey on Energy Metabolism during Wound Healing in Rats, 2009.
<http://doi.org/10.3814/2009/715320>
- Sumoprastowo, R. (1993). *Beternak Lebah Madu*

Modern. Jakarta: Bhratara Karya Aksara.

Suranto, A. (2004). *Khasiat dan manfaat madu herbal*. Jakarta: Agromedia Pustaka.

Wasitaatmadja, S. (1997). *Penuntun Ilmu Kosmetik Medik*. Jakarta: UI Press.

Weller, A. W. & P. . (1994). *Hanbook of pharmaceutical excipients: Microcrystalline cellulose*. London: The